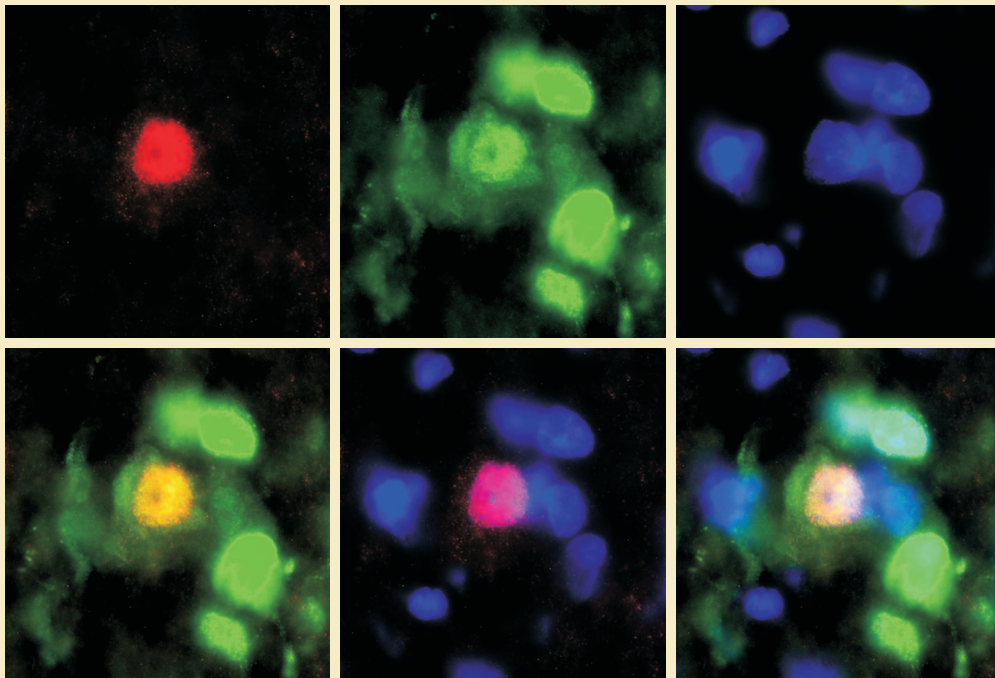


**JÖRG MÜTZE**

**IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER  
LEPTIN-INDUZIERTEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN  
STAT3 UND STAT5 IM GEHIRN DER RATTE**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: PD Dr. Thomas Hübschle

**Immunhistochemische Analyse der  
Leptin-induzierten Transkriptionsfaktoren  
STAT3 und STAT5  
im Gehirn der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Jörg Mütze**

Tierarzt aus Frankenberg (Hessen)

Gießen 2005

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: PD Dr. Thomas Hübschle  
Prof. Dr. Reto Neiger

**Tag der Disputation: 09.09.05**



*meiner Verlobten und meinen Eltern gewidmet*



## Inhaltsverzeichnis

|  |          |
|--|----------|
| <b>1. KAPITEL</b>  | <b>1</b> |
| <b>EINLEITUNG</b>  | <b>1</b> |
| 1.1. Molekularer Aufbau des Hormons „Leptin“ des weißen Fettgewebes        | 1        |
| 1.2. Entdeckung und Historie   | 3        |
| 1.3. Synthese und Freisetzung  | 6        |
| 1.3.1. Beeinflussung der Leptin-Synthese und -Sekretion                    | 6        |
| 1.4. Transport und Transportproteine                                       | 7        |
| 1.5. Übertritt in das Gehirn   | 7        |
| 1.5.1. Transport über die Blut-Hirn-Schranke                               | 8        |
| 1.5.2. Diffusion in Hirnregionen   | 9        |
| 1.6. Signaltransduktion  | 10       |
| 1.6.1. Molekularer Aufbau der Leptin-Rezeptor-Isoformen                    | 10       |
| 1.6.2. Signalkaskade und Gentranskription                                  | 12       |
| 1.6.2.1. JAK-STAT-Kaskade  | 13       |
| 1.6.2.1.1. STAT3   | 16       |
| 1.6.2.1.2. STAT5   | 17       |
| 1.7. Abbau und Elimination   | 19       |
| 1.8. Das Problem der Leptin-Resistenz                                      | 19       |
| 1.9. Leptin-vermittelte Wirkungen auf den Organismus                       | 22       |
| 1.9.1. Regulation von hypothalamischen Neurotransmittern und Neuropeptiden | 23       |
| 1.9.1.1. Das Neuropeptid Y (NPY)   | 24       |
| 1.9.1.2. Das Agouti-verwandte Peptid (AgRP)                                | 24       |
| 1.9.1.3. Das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH)                          | 25       |
| 1.9.1.4. Das Orexin bzw. Hypokretin  | 25       |
| 1.9.1.5. Das Proopiomelanocortin (POMC)                                    | 26       |
| 1.9.1.6. Das Cocain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART)           | 27       |
| 1.9.1.7. Das Galanin-ähnliche Peptid (GALP)                                | 27       |
| 1.9.1.8. Der „brain derived neurotrophic factor“ (BDNF)                    | 28       |
| 1.9.2. Regulation auf Ebene des autonomen Nervensystems                    | 28       |
| 1.9.3. Regulation auf Ebene des Neuroendokriniums (Hypophyse)              | 29       |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.9.3.1. Regulation der Gonadotropine                                 | 30        |
| 1.9.3.2. Regulation der Glucocorticoide                               | 30        |
| 1.9.3.3. Regulation der Schilddrüsenhormone                           | 32        |
| 1.9.3.4. Regulation des Wachstumshormons                              | 33        |
| 1.9.3.5. Regulation des Prolaktins                                    | 33        |
| 1.10. Zielstrukturen für Leptin im <i>Hypothalamus</i> der Ratte      | 34        |
| 1.10.1. Der Nucleus arcuatus (ARC)                                    | 35        |
| 1.10.2. Der Nucleus hypothalamicus ventromedialis (VMH)               | 38        |
| 1.10.3. Der Nucleus hypothalamicus dorsomedialis (DMH)                | 39        |
| 1.10.4. Der Nucleus paraventricularis (PaV)                           | 40        |
| 1.10.5. Die Area laterale hypothalami (LH)                            | 42        |
| 1.10.6. Die Area retrochiasmatica (RCH)                               | 43        |
| 1.10.7. Der Nucleus praemamillaris ventralis (PMV)                    | 44        |
| 1.11. Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit     | 45        |
| <b>2. KAPITEL:</b>  | <b>49</b> |
| <b>MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>49</b> |
| 2.1. Versuchstiere  | 49        |
| 2.2. Operation  | 49        |
| 2.2.1. Narkose  | 50        |
| 2.2.2. i.c.v.-Kanülierung des Ventriculus lateralis (V <sub>l</sub> ) | 50        |
| 2.2.3. Angiotensin-II-Trinktest                                       | 53        |
| 2.3. Verwendete Substanzen  | 54        |
| 2.3.1. Leptin   | 54        |
| 2.3.2. Pyrogenfreie, isotonische Kochsalzlösung zur Applikation       | 54        |
| 2.4. Verwendete Lösungen und Puffer                                   | 55        |
| 2.4.1. Phosphatpuffer (PB)  | 55        |
| 2.4.2. Paraformaldehyd- (PFA) Lösung                                  | 55        |
| 2.4.3. Saccharoselösung (Sucrose)                                     | 56        |
| 2.4.4. Isotonische Kochsalzlösung (Saline) zur Perfusion              | 56        |
| 2.5. Durchführung der Tierversuche                                    | 56        |
| 2.5.1. Stimulation der Versuchstiere                                  | 56        |
| 2.5.1.1. Zentrale Stimulation (i.c.v.)                                | 56        |

|  |    |
|--|----|
| 2.5.1.2. Systemische Stimulation (i.p.)                                | 57 |
| 2.5.2. Perfusion   | 57 |
| 2.6. Präparation der Gehirne   | 58 |
| 2.6.1. Aufbereitung für die „free-floating-Methode“                    | 59 |
| 2.6.2. Aufbereitung für die „Fluoreszenz-Methode“                      | 59 |
| 2.7. Schneiden der Gehirne   | 59 |
| 2.7.1. Schneiden für die „free-floating-Methode“                       | 60 |
| 2.7.2. Schneiden für die „Fluoreszenz-Methode“                         | 60 |
| 2.8. Analyse der Gehirnproben  | 61 |
| 2.8.1. Grundlage der Immunhistochemie                                  | 61 |
| 2.8.1.1. Avidin-Biotin-Methode   | 61 |
| 2.8.2. Verwendete Antikörper   | 63 |
| 2.8.2.1. Der anti-STAT3-Antikörper                                     | 63 |
| 2.8.2.2. Der anti-STAT5-Antikörper                                     | 64 |
| 2.8.3. Immunhistochemische Protokolle                                  | 65 |
| 2.8.3.1. Verwendete Substanzen und Lösungen                            | 65 |
| 2.8.3.2. „Free-floating-Methode“                                       | 65 |
| 2.8.3.3. „Fluoreszenz-Methode“   | 68 |
| 2.8.3.3.1. Weiterführendes Protokoll mit dem neuronalen Marker (NeuN)  | 70 |
| 2.8.3.3.2. Weiterführendes Protokoll mit dem endothelialen Marker (vW) | 71 |
| 2.8.3.3.3. Weiterführendes Protokoll mit dem Astrozyten-Marker (GFAP)  | 71 |
| 2.9. Analyse der Blutproben  | 72 |
| 2.9.1. Der Leptin-Radioimmunoassay (RIA)                               | 72 |
| 2.9.1.1. Prinzip des Leptin-Radioimmunoassays                          | 72 |
| 2.9.1.2. Durchführung des Leptin-Radioimmunoassays                     | 73 |
| 2.9.2. Der Interleukin-6-(IL-6)-Bioassay                               | 74 |
| 2.9.2.1. Prinzip des IL-6-Bioassays                                    | 74 |
| 2.9.2.2. Verwendete Zelllinie  | 74 |
| 2.9.2.3. Vorbereitung der Zellen für den IL-6-Bioassay                 | 76 |
| 2.9.2.4. Durchführung des IL-6-Bioassays                               | 76 |
| 2.9.3. Der Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Bioassay                         | 78 |
| 2.9.3.1. Prinzip des TNF-Bioassays                                     | 78 |
| 2.9.3.2. Verwendete Zelllinie  | 78 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.9.3.3. Vorbereitung der Zellen für den TNF-Bioassay   | 79        |
| 2.9.3.4. Durchführung des TNF-Bioassays   | 80        |
| 2.10. Auswertung und Statistik  | 81        |
| 2.10.1. Histologie  | 81        |
| 2.10.1.1. Durchlicht-Mikroskopie  | 82        |
| 2.10.1.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopie  | 82        |
| 2.10.2. Auswertung der Assays   | 85        |
| 2.10.2.1. Leptin-Radioimmunoassay   | 85        |
| 2.10.2.2. IL-6-Bioassay   | 86        |
| 2.10.2.3. TNF-Bioassay  | 87        |
| 2.11. Versuchsprotokolle  | 88        |
| 2.11.1. i.c.v.-Applikation  | 88        |
| 2.11.2. i.p.-Applikation  | 89        |
| <b>3. KAPITEL:</b>  | <b>90</b> |
| <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>90</b> |
| 3.1. Nachweis des Transkriptionsfaktors STAT3 nach peripherer Stimulation                           | 90        |
| 3.1.1. Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT3-Translokation   | 90        |
| 3.1.2. Neuroanatomischer Nachweis der STAT3-Translokation in unterschiedlichen Zelltypen des ZNS    | 98        |
| 3.1.2.1. STAT3-Translokation in Neuronen  | 98        |
| 3.1.2.2. STAT3-Translokation in Endothelzellen  | 103       |
| 3.1.2.3. STAT3-Translokation in Zellen des Plexus choroideus (PC)                                   | 106       |
| 3.2. Nachweis des Transkriptionsfaktors STAT5   | 107       |
| 3.2.1. Zentrale Stimulation (i.c.v.)  | 107       |
| 3.2.1.1. Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT5-Translokation | 107       |
| 3.2.2. Periphere Stimulation (i.p.)   | 112       |
| 3.2.2.1. Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT5-Translokation | 112       |
| 3.2.2.2. Quantitative Auswertung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation               | 119       |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.2.3. Neuroanatomischer Nachweis der Leptin-induzierten nukleären STAT5-<br>Translokation in unterschiedlichen Zelltypen des zentralen Nervensystems | 121        |
| 3.2.2.3.1. STAT5-Translokation in Neuronen  | 121        |
| 3.2.2.3.2. STAT5-Translokation in Astrozyten  | 129        |
| 3.2.2.3.3. STAT5-Translokation in Ependymzellen   | 132        |
| 3.2.3. Neuroanatomischer Vergleich der nukleären STAT5-Translokation nach zentraler<br>und peripherer Leptin-Applikation                                | 135        |
| 3.3. Quantitativer Vergleich der Leptin-induzierten nukleären STAT3- und STAT5-<br>Translokation im ARC   | 137        |
| 3.4. Messung der Plasma-Zytokin-Konzentrationen nach systemischer Stimulation   | 138        |
| 3.4.1. Messung der Leptin-Konzentrationen   | 138        |
| 3.4.2. Messung der IL-6-Konzentrationen   | 139        |
| 3.4.3. Messung der TNF-Konzentrationen  | 140        |
| 3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse   | 141        |
| <b>4. KAPITEL</b>   | <b>144</b> |
| <b>DISKUSSION</b>   | <b>144</b> |
| 4.1. Überlegungen zur Methodik  | 144        |
| 4.1.1. Wahl des Injektionsweges für die Leptin-Applikation  | 144        |
| 4.1.2. Wahl des Markers für Leptin-aktivierte Zellen im ZNS   | 145        |
| 4.1.2.1. Alternative Möglichkeiten zur Detektion Leptin-aktivierter Zellen  | 147        |
| 4.1.3. Problem der STAT-Markierung in Endothelzellen  | 149        |
| 4.2. Die STAT-Kartierung  | 150        |
| 4.2.1. Überlegungen zur Spezifität der nukleären STAT-Translokation   | 150        |
| 4.2.2. STAT3  | 152        |
| 4.2.2.1. Neurone  | 154        |
| 4.2.2.2. Endothelzellen   | 156        |
| 4.2.2.3. Andere Zellphänotypen  | 157        |
| 4.2.3. STAT5  | 158        |
| 4.2.3.1. Neurone  | 160        |
| 4.2.3.2. Andere Zellphänotypen  | 162        |
| 4.3. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven  | 163        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>5. KAPITEL</b>                            | <b>166</b> |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>                       | <b>166</b> |
| <b>SUMMARY</b>                               | <b>168</b> |
| <b>6. KAPITEL</b>                            | <b>170</b> |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>                 | <b>170</b> |
| <b>7. KAPITEL:</b>                           | <b>173</b> |
| <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>                  | <b>173</b> |
| <b>8. KAPITEL</b>                            | <b>199</b> |
| <b>ANHANG</b>                                | <b>199</b> |
| 8.1. Publikationen                           | 199        |
| 8.1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften | 199        |
| 8.1.2. Veröffentlichte Abstracts             | 199        |
| 8.2. Danksagung                              | 200        |
| 8.3. Erklärung                               | 201        |



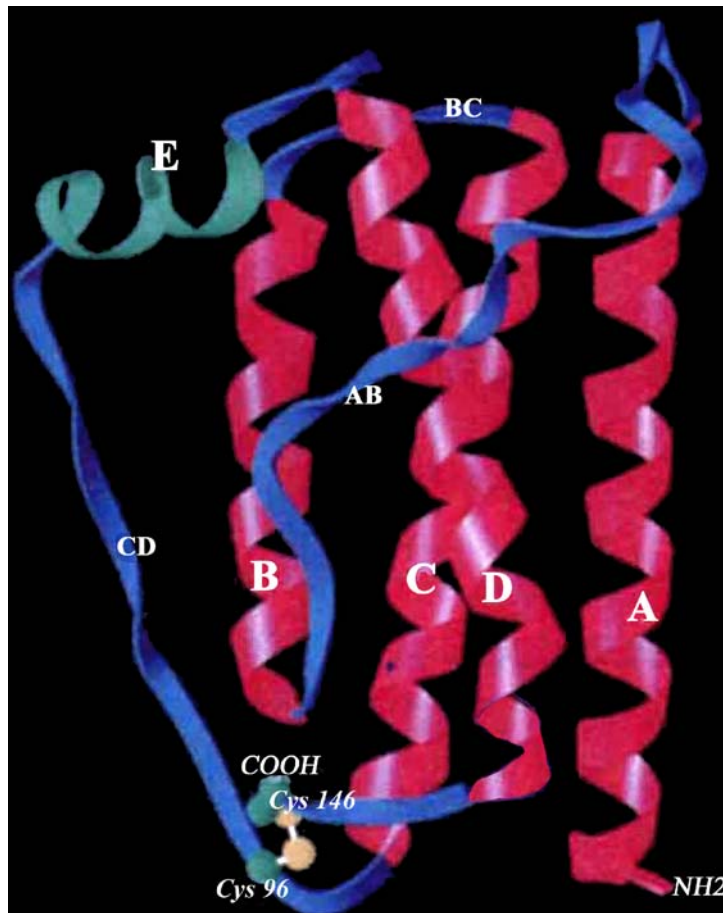
# 1. KAPITEL

## Einleitung

### 1.1. Molekularer Aufbau des Hormons „Leptin“ des weißen Fettgewebes

Der Name Leptin stammt von dem griechischen Wort „*leptos*“ (dünn) ab. Leptin ist ein nicht glykosyliertes (Otero et al. 2005) Proteinprodukt des „ob-Gens“ (siehe unten). Es wird in die Superfamilie der Typ-I-Zytokine eingeordnet, wozu neben anderen auch der Wachstumsfaktor, das Prolaktin und das Interleukin-3 (IL-3) gehören (Otero et al. 2005). Es besteht aus 167 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 16kDa. 21 Aminosäuren am N-terminalen Ende besitzen die Funktion einer sekretorischen Signal-Sequenz und werden während der Freisetzung aus Adipozyten abgespalten, so dass sich die im Blut zirkulierende Form nur aus 146 Aminosäuren mit 14kDa zusammensetzt (Zhang et al. 1994, Considine and Caro 1997, Zhang et al. 1997). Die sekretorische Signal-Sequenz ist neben der Freisetzung aus Adipozyten auch für die Steuerung der Speicherung in Mikrosomen verantwortlich. Die Homologie zwischen humanem (vom Menschen stammendem) und murinem (von der Maus stammendem) Leptin ist mit 84% sehr hoch und murines Leptin stimmt zu 83% mit dem der Ratte überein (Zhang et al. 1997, Ahima and Flier 2000). Bis zu 67% der humanen und murinen Sequenz ist mit der von anderen Spezies wie Primaten, Hunden, Kühen und Schweinen identisch (Zhang et al. 1997). Das synthetisch hergestellte Leptin-E-100, welches durch eine Substitution von Glu (Glutamat) durch Trp (Tryptophan) an der Position 100 des humanen Leptins hergestellt wurde (Zhang et al. 1997), besteht aus vier links-windenden  $\alpha$ -Helices (Abb. 1: A, B, C und D), die durch zwei lange Verbindungsschleifen zwischen „A“ und „B“ sowie „C“ und „D“ und durch eine kurze Verbindungsschleife zwischen „B“ und „C“ miteinander verknüpft sind. Zwischen „C“ und „D“ ist eine kurze Helixstruktur „E“ eingebettet. Die letzten fünf Aminosäuren Gln (Glutamin) 139 bis Ser (Serin) 143 der  $\alpha$ -Helix „D“ bilden einen sogenannten „Knoten“. Eine Mutation an dieser Stelle führt zur biologischen Inaktivität des Proteins (Zhang et al. 1997). Ebenso befindet sich eine Disulfidbrücke auf der  $\alpha$ -Helix „D“, welche zusätzlich die biologische Aktivität des Proteins bestimmt und an der Aminosäure Cys (Cystein) 146 mit der Verbindungsschleife „CD“ an der Aminosäure Cys 96 verbunden ist (Grasso et al. 1997). Die dreidimensionale Struktur ist der des humanen Wachstumshormons (hGH), des Kolonie-stimulierenden Faktors der Granulozyten (G-CSF) und des Leukämie-hemmenden Faktors (LIF) sehr ähnlich. Die Unterschiede bestehen erstens in sogenannten „Knoten“, die außer bei Leptin in der Mitte der Helices „A“, „B“ und „D“

angeordnet sind, zweitens in einer bei Leptin um zwei Umdrehungen kürzeren  $\alpha$ -Helix „B“ und drittens in weiteren Extrahelices auf der Verbindungsschleife zwischen „A“ und „B“, die bei Leptin nicht vorhanden sind. Diese unterschiedlichen Strukturen sind wichtig für die spezifische Bindung von Leptin an seinem Rezeptor (Zhang et al. 1997).



**Abb. 1**  
Dreidimensionale Struktur von Leptin-E-100. Rot:  $\alpha$ -Helices „A“, „B“, „C“ und „D“. Grün: kurze Helix „E“. Blau: Verbindungsschleifen zwischen „A“ und „B“ = „AB“, „B“ und „C“ = „BC“ und „C“ und „D“ = „CD“. Das N-terminale Ende ist mit „NH<sub>2</sub>“ und das C-terminale mit „COOH“ gekennzeichnet. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Disulfidbrücke (gekennzeichnet durch ein Atommodell) zwischen Cys 96 und Cys 146 auf der „AB“-Verbindungsschleife. Modifizierte Abbildung nach Zhang et al. (1997).

Das ob-Gen liegt beim Menschen und ebenso bei der Ratte auf dem Chromosom 7q31.3 und wird von über 15000 Basenpaaren codiert (Green et al. 1995, Isse et al. 1995). Bei der Maus liegt es auf Chromosom 6 (He et al. 1995). Es besitzt drei Exons sowie zwei Introns mit der kodierenden Region auf Exon zwei und drei. Die Promotor-Region (–26 bis –30) beinhaltet Elemente, die direkt durch zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) (CREB = „cAMP responsive element binding-protein“) und Glucocorticoide (GRE = „glucocorticoid responsive element“) aktivierbar sind, sowie Bindungsstellen für Enhancer-Moleküle und SP-1-Proteine („specific proteins“, die an GC-reichen Sequenzen binden) (Gong et al. 1996, Hwang et al. 1996). Die basale Gen-Expression in Adipozyten ist nur auf den ersten 217 Basenpaaren codiert, somit muss eine Hemmung der Transkription am 5'-Ende des Promotors angreifen (Gong et al. 1996, Miller et al. 1996). Das ob-Gen ist hauptsächlich in den weißen Fettgewebszellen vertreten, kommt aber auch in braunen Adipozyten (Moinat et al. 1995,

Cinti et al. 1997, Dessolin et al. 1997), der Plazenta (Hoggard et al. 1997, Masuzaki et al. 1997), der Skelettmuskulatur (Wang et al. 1998), den Milchdrüsen (Smith-Kirwin et al. 1998), der Hypophyse (Jin et al. 2000) und dem Epithel des Magenfundus (Bado et al. 1998) vor.

## 1.2. Entdeckung und Historie

Die Entdeckung von Leptin hat seine Wurzeln bereits im Jahre 1950 als eine spontane rezessive genetische Mutation bei ingezogenen Hausmäusen (ob/ob-Mäuse) entdeckt wurde. Diese Mäuse besaßen ein defektes ob-Gen (1.1.), was folglich zu einem biologisch inaktiven Proteinprodukt (heute als Leptin bekannt) führte. Phänotypisch zeichnete sich diese Mutation hauptsächlich durch das Auftreten von Adipositas und Diabetes aus (Ingalls et al. 1950). 1953 stellte Kennedy die lipostatische Theorie auf, die besagte, dass der *Hypothalamus* Konzentrationen eines bisher unbekannten zirkulierenden Faktors misst, der Informationen über die Menge des eingelagerten Fettgewebes übermittelt. Daraufhin würden hypothalamisch vermittelt Änderungen im Fressverhalten veranlasst werden (Kennedy 1953). 1959 führte Hervey zur Bestätigung dieser Hypothese Parabiose-Versuche (Abb. 2) an Ratten durch, bei denen er zwei Ratten mit ihrem Peritoneum und der Bauchmuskulatur aneinander nähte. Dadurch war ein ständiger und langsamer Austausch der kapillären Filtrate, jedoch nicht des Blutes, gewährleistet. Auf diese Weise konnten filtrierte Moleküle auf den anderen Partner übergehen (Huff et al. 1950). In einem ersten Versuchsansatz setzte er Läsionen im *Nucleus hypothalamicus ventromedialis* (VMH), einem in der zentralnervösen Regulation der Nahrungsaufnahme involvierten Kerngebiet des *Hypothalamus*. Durch die Läsionen wurde die VMH-vermittelte Hemmung des Fressverhaltens unterdrückt und Hervey beobachtete in den läsionierten Tieren eine progressive Gewichtszunahme. Bei parabiotischen Ratten zeigte der läsionierte Partner folglich Hyperphagie und Gewichtszunahme, der gesunde Partner jedoch Aphagie und Gewichtsreduktion (Abb. 2a). Dies bedeutete, dass bei dem läsionierten Tier ein Stoff sezerniert wurde, der in den gesunden Partner übertrat und ein Sättigungsgefühl auslöste, wobei offensichtlich im läsionierten Tier solch ein Sättigungs-Signal unwirksam blieb. Folglich mussten dafür verantwortliche Rezeptoren im VMH lokalisiert sein. In einem zweiten Versuchsansatz mittels einer VMH-Läsionierung beider Tiere beobachtete er eine deutliche Gewichtszunahme bei beiden Ratten (Abb. 2b). Schließlich konnte er in einem dritten Versuch mit VMH-Läsionierung nur eines Tieres zeigen, dass bei gleichzeitiger Futterrestriktion beide Ratten ein normales Körpergewicht behielten (Abb. 2c). Somit musste

der Stoff infolge der erhöhten Nahrungsaufnahme (Gewichtszunahme) synthetisiert worden sein (Hervey 1959).

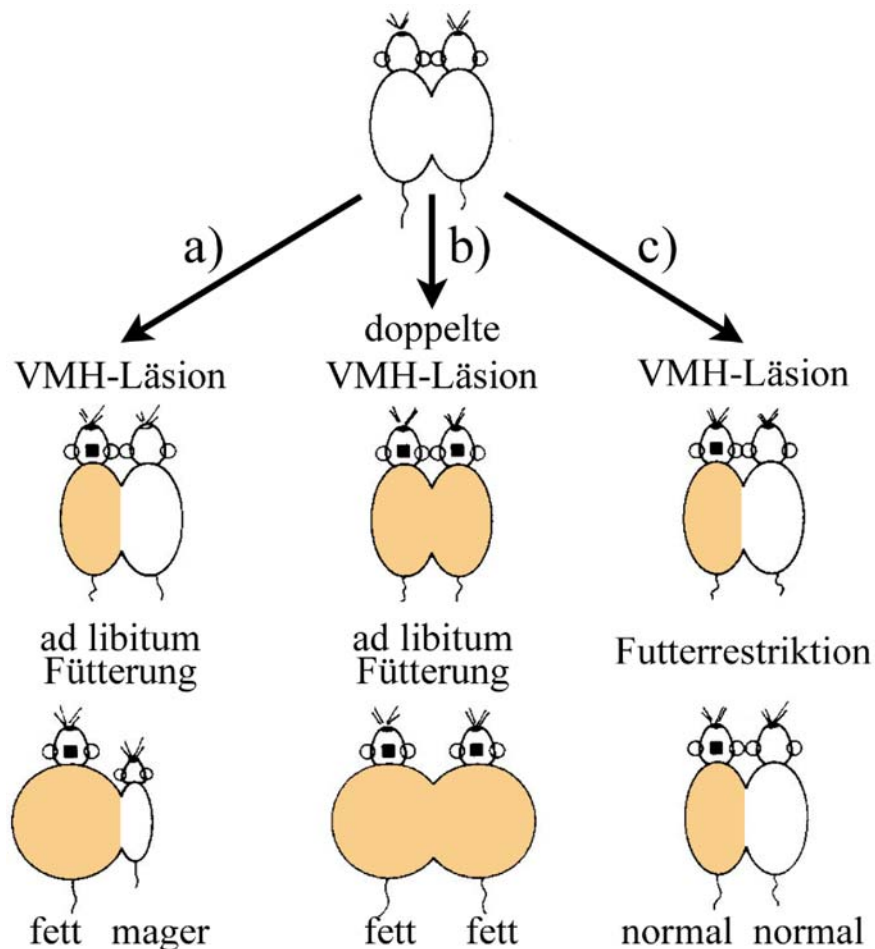
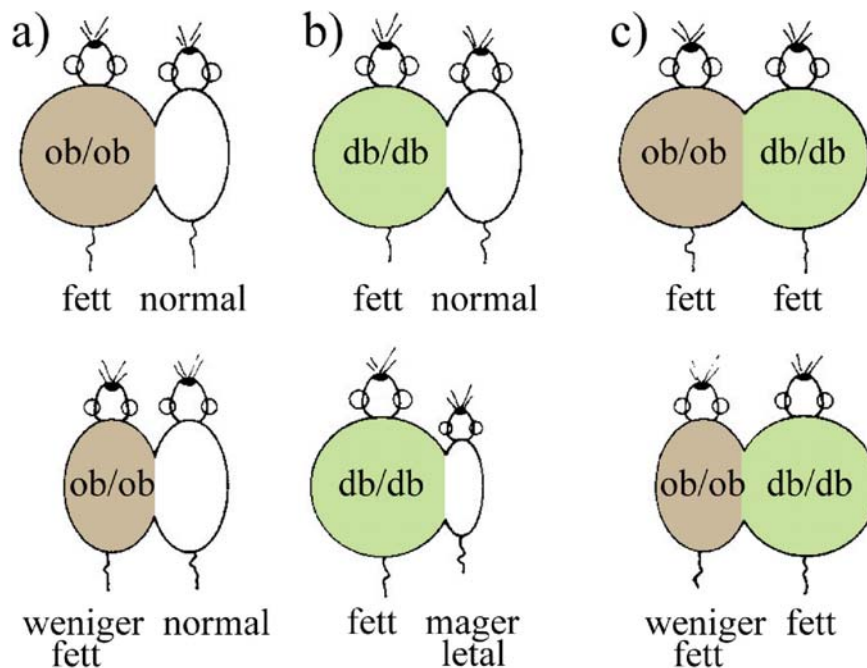


Abb. 2

Parabiotische Ratten mit VMH-Läsionierung (ocker) einer Ratte und *ad libitum*-Fütterung (a), VMH-Läsionierung beider Ratten und *ad libitum*-Fütterung (b) sowie VMH-Läsionierung einer Ratte mit Futterrestriktion (c). Modifizierte Abbildung nach Casanueva and Dieguez (1999).

In den 60er Jahren wurden weitere genetische Mutationen bei Mäusen bzw. Ratten entdeckt, die phänotypisch Adipositas, Hyperphagie und reduzierten Energieverbrauch aufwiesen. Tiere mit solchen Mutationen sind heute als db/db-Maus oder fa/fa-Ratte bzw. „Zucker-rat“ bekannt. Bei diesen Tieren besteht ein Defekt im db-Gen (diabetes-Gen, 1.6.1.), was zur Bildung von defekten Leptin-Rezeptoren führt (Hukshorn and Saris 2004). 1969 setzte Coleman die Parabioseversuche an diesen Gen-defekten Mäusen fort. Er nähte erstens eine ob/ob-Maus, die bis zu 300% des Normalgewichts erreichen kann, mit einer gesunden Maus zusammen (Abb. 3a). Coleman beobachtete, dass nach einiger Zeit die ob/ob-Maus ein annähernd normales Körpergewicht annahm, wobei die normale Maus keine Veränderungen in ihrer Gestalt aufwies. Im nächsten Schritt kombinierte er eine db/db-Maus mit einer gesunden Maus (Abb. 3b). Nach einiger Zeit bemerkte Coleman bei der Gen-defekten Maus

keine Veränderung, wohingegen die normale Maus teilweise bis zur Letalität abmagerte. Schließlich kombinierte er eine ob/ob-Maus mit einer db/db-Maus (Abb. 3c) und stellte fest, dass die ob/ob-Maus an Gewicht verlor, wobei die db/db-Maus ihr korpulentes Körpergewicht beibehielt (Coleman and Hummel 1969, Coleman 1973). Diese Ergebnisse zeigten, dass die ob/ob-Mäuse im Gegensatz zu db/db-Mäusen keinen Sättigungsfaktor synthetisieren, zweite aber gegenüber diesem Sättigungsfaktor insensitive sind.



**Abb. 3**

**Parabiotische Mäuse. a): eine ob/ob-Maus (defektes ob-Gen und damit ein adipöser Phänotyp) mit einer normalen Maus. b): eine db/db-Maus (defektes db-Gen und damit ein defekter Leptin-Rezeptor) in Parabiose mit einer normalen Maus. c): eine ob/ob- und eine db/db-Maus miteinander verbunden. Modifizierte Abbildung nach Casanueva and Dieguez (1999).**

Dem Sättigungs-Zentrum und auch dem Sättigungs-Faktor kamen schließlich Friedman und seine Mitarbeiter 1994 bzw. 1995 auf die Spur. Ihnen gelang es durch „positional cloning“ das ob-Gen (1.1.) und den Leptinrezeptor (1.6.1.) in der Maus zu charakterisieren und zu identifizieren. Das Produkt des ob-Gens, das er „Leptin“ nannte, wird hauptsächlich vom weißen Fettgewebe synthetisiert und informiert das Gehirn über das eingelagerte Fettgewebe (Fettdepots). Es wurde diesen Wissenschaftlern somit klar, dass ein neues physiologisches System entdeckt wurde, das in der Lage ist, das Körpergewicht zu regulieren (Zhang et al. 1994).

### 1.3. Synthese und Freisetzung

Die Synthese des Hormons Leptin geht vom ob-Gen aus (1.1.) und findet fast ausschließlich im weißen Fettgewebe, bei Nagern im Gegensatz zum Menschen vor allem in omentalen und epididymalen weniger in subkutanen Depots, statt (Margetic et al. 2002). Sie korreliert direkt positiv mit der Fettgewebsmasse sowie der Adipozytengröße und die Plasma-Konzentration an Leptin steigt proportional mit steigender mRNA-Synthese (ob-Gen-Transkription) an (Hamilton et al. 1995, Considine et al. 1996). Nach der Synthese wird Leptin in Mikrosomen gespeichert und anschließend in das Blutgefäßsystem sezerniert.

#### 1.3.1. Beeinflussung der Leptin-Synthese und -Sekretion

Die zirkulierende Leptin-Konzentration steigt bei Nagern unmittelbar nach der Futteraufnahme an, beim Menschen hingegen erst nach langfristig erhöhter Nahrungsaufnahme, und fällt während Hungerzuständen schnell wieder ab (Frederich et al. 1995, Kolaczynski et al. 1996). Ein erhöhter Energieverbrauch (z.B. körperliche Arbeit oder Kälteexposition) bewirkt eine Senkung des Plasma-Leptin-Spiegels (Trayhurn et al. 1995, Hardie et al. 1996, Zheng et al. 1996). Dies wird über einen erhöhten Sympathikotonus vermittelt. Katecholamine hemmen direkt über  $\beta_3$ -Rezeptoren (bei Nagern) sowie  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren (beim Menschen) in weißen Fettgewebszellen die Leptin-Synthese und -Sekretion (Rayner 2001, Rayner and Trayhurn 2001). Neben der Regulation durch das sympathische Nervensystem haben einige Hormone einen modulierenden Einfluss auf die Biosynthese von Leptin. Insulin (Saladin et al. 1995, Considine and Caro 1997), Östrogene (Kennedy et al. 1997, Montague et al. 1997), Glucocorticoide (De Vos et al. 1998, Margetic et al. 2002) und das Wachstumshormon (GH) (Gill et al. 1999) wirken positiv, Testosteron (Wabitsch et al. 1997) und TSH (*Thyroidea* stimulierendes Hormon, Thyreotropin) (Escobar-Morreale et al. 1997) wirken negativ auf die Leptin-Synthese. Der Leptin-Spiegel unterliegt einem zirkadianen Rhythmus, der an die Nahrungsaufnahme gekoppelt ist. Der auslösende Faktor für die Schwankungen der Leptin-Konzentration ist das während der Mahlzeit vermehrt im Blut zirkulierende Insulin (Schoeller et al. 1997). Die Glucocorticoid-Sekretion ist zwar an die Nahrungsaufnahme gekoppelt, stimuliert aber unabhängig davon die Leptin-Synthese (Margetic et al. 2002). Insulin und Glucocorticoide greifen direkt am Promotor (GRE) des ob-Gens an und stimulieren die Gen-Transkription (Wabitsch et al. 1996). Zusätzlich zum zirkadianen Rhythmus wird Leptin pulsatil in die Blutbahn ausgeschüttet. Diese Pulse sind einerseits zu den Glucocorticoid-Spiegeln (Licinio et al. 1997) und andererseits zu den

Schwankungen im Sympathikotonus (siehe oben) negativ korreliert (Rayner and Trayhurn 2001). Neben den physiologischen Parametern spielen auch pathologische Prozesse bei der Modulation der Leptin-Biosynthese eine gewisse Rolle. Akute Infektionen, Endotoxine und die dadurch gebildeten Zytokine wie IL-1, Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), und LIF wirken stimulierend auf die endogene Leptin-Freisetzung (Grunfeld et al. 1996, Janik et al. 1997, Mantzoros et al. 1997, Sarraf et al. 1997, Zhang et al. 2000).

#### **1.4. Transport und Transportproteine**

Der Transport von Leptin von seinem Freisetzungsort zu seinem Wirkort (Ort der Leptin-Rezeptoren, 1.6.1.) geschieht über den Blutweg. Während der Zirkulation ist es einerseits frei, hauptsächlich aber an spezifische Transportproteine gebunden (Lammert et al. 2001). Diese Bindungsproteine („soluble leptin receptor“ bzw. Ob-Re) entsprechen der extrazellulären Domäne der langen und der kurzen Leptin-Rezeptor-Isoform/en (Houseknecht et al. 1996). Die Funktion der Bindungsproteine besteht darin, die biologische Aktivität von Leptin zu regulieren. Gebundenes Leptin kann das Gefäßsystem nicht verlassen und damit auch keine funktionellen Rezeptoren im Gewebe aktivieren. In mageren Individuen kommt Leptin zu ca. 60-98% in gebundener Form im Blut vor, wohingegen in adipösen Individuen bis zu 72% frei im Blut zirkulieren. Hunger führt zu einer Reduktion der freien Fraktion und einer Erhöhung des Anteils der gebundenen Form, wodurch Leptin aus seiner biologisch aktiven Form in eine inaktive Form übergeht (Sinha et al. 1996). Der Anteil an gebundenem Leptin korreliert negativ mit der Körpermasse. Je adipöser ein Individuum ist, desto weniger Leptin ist an Transportproteine gebunden. Eine Gewichtsreduktion bewirkt ein Ansteigen des Bindungsprotein-Spiegels, wodurch sich die gebundene Leptin-Fraktion erhöht (Laimer et al. 2002). Bei Zunahme der Körpermasse sinkt der Anteil der Bindungsproteine und damit die Fraktion des gebundenen Leptins im Blut (Van Dielen et al. 2002). Der lösliche Rezeptor Ob-Re kann somit als ein „Puffersystem“ für frei zirkulierendes Leptin verstanden werden (Lollmann et al. 1997).

#### **1.5. Übertritt in das Gehirn**

Grundsätzlich kann Leptin auf drei unterschiedlichen Wegen das Gehirn erreichen. Der erste Weg ist der Transport über einen sättigbaren aktiven Transport-Mechanismus über die Blut-Hirn-Schranke (1.5.1.) (Banks et al. 1996). Der zweite Weg ist die Diffusion in Leptin-

responsive Kerngebiete, die in der Nähe der sogenannten zirkumventrikulären Organe (CVOs), Strukturen mit offener Blut-Hirn-Schranke, liegen. Hier können große Proteine die Gefäße verlassen und ins Gewebe diffundieren. Dies trifft vor allem auf die Kerngebiete zu, die im ventrobasalen *Hypothalamus* lokalisiert sind (Rivest 2002). Die dritte Möglichkeit für Leptin das Gehirn zu erreichen, ist der Transport über die Zerebrospinal-Flüssigkeit (*Liquor*) mit anschließender Diffusion in die Ventrikel-umgebenden Hirnareale (Schwartz et al. 1996b). So ist nach einer intracerebroventrikulären (i.c.v.-) Injektion von Leptin dessen Bindung an Ventrikel-umgebende hypothalamische Gebiete höher als nach systemischer Gabe (Maness et al. 1998). Der Transport aus dem Blut in den *Liquor* bzw. über die Blut-Hirn-Schranke ist unter anderem durch einen speziellen Subtyp der Leptin-Rezeptoren (Ob-Ra, 1.6.1.), der in hohen Konzentrationen in Kapillaren und im *Plexus choroideus* (PC) vorkommt, vermittelt (Bjorbaek et al. 1998b, Hileman et al. 2002). Da „Koletsy-Ratten“, die keinerlei Leptin-Rezeptoren exprimieren, in ihrem *Liquor* aber trotzdem gewisse Leptin-Konzentrationen aufweisen, muss es noch einen bis heute unbekannten weiteren Mechanismus für den Übertritt aus dem Blut in den *Liquor* geben (Wu-Peng et al. 1997).

#### **1.5.1. Transport über die Blut-Hirn-Schranke**

Die Blut-Hirn-Schranke zeichnet sich durch eine spezialisierte Form von Kapillaren innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) aus. Die als kontinuierlicher Kapillartyp bezeichneten Gefäße mit besonders dichten „tight junctions“ bestehen aus Endothelzellen, einer Basalmembran sowie aufgelagerten Astrozyten und Mikroglia-Zellen, welche die Blutgefäße zum Hirnparenchym hin besonders abdichten. Ein Stoffaustausch vom Blut zu den Nervenzellen ist hier für lipophile niedermolekulare Substanzen und Wasser *per diffusionem* durch die Interzellularspalten oder aber durch aktiven Transport mittels spezieller Transportproteine möglich. Leptin als ein vergleichsweise hochmolekulares Protein kann die Blut-Hirn-Schranke über einen solchen aktiven Transport-Mechanismus überwinden (Banks 2004). Der aktive Transport ist sättigbar, da hohe Leptin-Werte keine höhere Transportrate hervorrufen. Ebenso verdrängt nicht-markiertes Leptin radioaktiv-markiertes aus dem Transportsystem (transportabhängige Leptin-Resistenz, 1.8.) und kann durch verschiedene Mediatoren beeinflusst werden (Banks 2004). Zum Beispiel können  $\alpha_1$ -Agonisten (Stimulatoren der (nor-) adrenergen Rezeptoren) und Triglyceride den Transport hemmen (transportabhängige Leptin-Resistenz bei Adipositas, da hier die Triglyceride im Blut erhöht sind), wohingegen Glukose und Insulin einen fördernden Effekt aufweisen (Banks 2004, Banks et al. 2004). Die Transportrate im mageren Individuum ist im *Hypothalamus* und PC



(Zlokovic et al. 2000), bei Adipositas dagegen im *Hippocampus* sowie in der *Pons medullaris* am höchsten (Banks 2004).

### 1.5.2. Diffusion in Hirnregionen

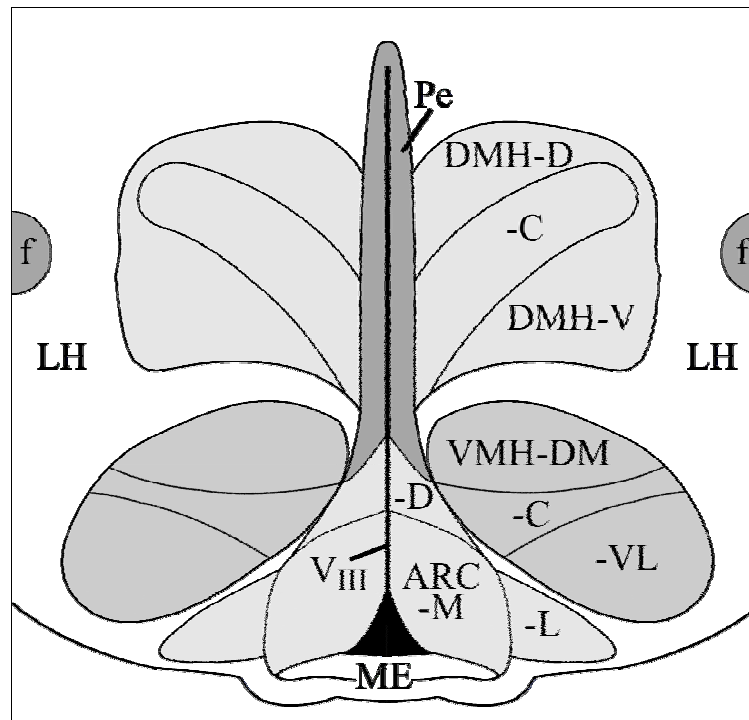


Abb. 4

Übersicht über den kaudalen *Hypothalamus* in etwa auf Höhe  $-3,3\text{mm}$  von Bregma. Angeschnitten sind der *Nucleus arcuatus* (ARC) mit seinem lateralen (-L), medialen (-M) und dorsalen (-D) Subkern, der *Nucleus hypothalamicus ventromedialis* (VMH) mit seinem dorsomedialen (-DM), zentralen (-C) und ventrolateralen (-VL) Subkern, der *Nucleus hypothalamicus dorsomedialis* (DMH) mit seinem ventralen (-V), kompakten (-C) und dorsalen (-D) Anteil, der *Nucleus periventricularis* (Pe), die *Area laterale hypothalami* (LH) und die *Eminentia mediana* (ME). f = Fornix; V<sub>III</sub> = *Ventriculus tertius*. Modifizierte Abbildung nach Paxinos and Watson (1998).

Die Blut-Hirn-Schranke ist in den CVOs offen, das heißt hier liegt ein fenestrierter Kapillartyp vor. Die Blutgefäße sind nicht durch „tight junctions“ abgedichtet und die Endothelzellen weisen transzelluläre Poren auf. Strukturen im ZNS mit einer offenen Blut-Hirn-Schranke sind vor allem die *Eminentia mediana* (ME), die *Hypophyse*, der PC, die *Glandula pinealis*, das *Organum subfornicale* (SFO), das *Organum vasculosum* der *Lamina terminalis* (OVLT) und die *Area postrema* (AP, vergleiche Abb. 15) (Prat et al. 2001). Hier können größere gelöste Proteine, Pathogene und sogar Immunzellen die Barriere zwischen Blut und Gehirn überwinden (Rivest 2002). Diese These wird dadurch unterstützt, dass Leptin seine Wirkung hauptsächlich im *Nucleus arcuatus* (ARC), der in unmittelbarer Nachbarschaft zur ME liegt, entfaltet. Es gibt Hinweise darüber, dass der ventrale Anteil des ARC (-L und

-M) eine offene Blut-Hirn-Schranke besitzt (Meister and Hakansson 2001). Ebenso kann Leptin über spezielle Ependymzellen (Tanyzyten), die in der ME vorkommen, in den *Ventriculus tertius* ( $V_{III}$ ) übertreten und von dort aus in andere Hirnregionen und in den PC gelangen (Meister and Hakansson 2001). Den Übertritt von Leptin in Areale, die von den CVOs weiter entfernt liegen (Abb. 4), vermutet Rivest in einer Passage über weniger dichte, aber selektive Arteriolen und Venolen in stark vaskularisierten Kerngebieten mit anschließender Diffusion zu responsiven Neuronen (Rivest 2002). Zudem gäbe es die Möglichkeit der Induktion von bis heute noch unbekannten Mediatoren, die in der Lage sind dieselbe Signalkaskade (1.6.2.) zu aktivieren, deren Produkte als Marker der zellulären Leptin-Antwort dienen (Rivest 2002).

## **1.6. Signaltransduktion**

### ***1.6.1. Molekularer Aufbau der Leptin-Rezeptor-Isoformen***

Die Wirkung von Leptin wird über spezielle Rezeptoren (Ob-R) vermittelt, die auf dem *db*-Gen kodiert sind (Tartaglia et al. 1995). Diese Rezeptoren werden in die Familie der „Klasse-I-Zytokin-Rezeptoren“ eingeordnet, zu denen auch Rezeptoren von IL-2, -3, -4, -6, -7, LIF, G-CSF, Corticotropin-Releasing Hormon (CRH), Prolaktin und Erythropoetin zählen, (Bazan 1989). Das *db*-Gen exprimiert sechs Subtypen, die nach der alphabetischen Reihenfolge Ob-Ra bis -Rf benannt wurden (Abb. 5). Alle sechs Isoformen besitzen eine charakteristische extrazelluläre Domäne. Fünf Subtypen (Ob-Ra bis -Rd und -Rf) haben zusätzlich noch eine transmembranöse (23 Aminosäuren) und eine intrazelluläre Domäne, die bis auf den transmembranösen Teil und die proximalen 29 Aminosäuren einschließlich der Box-1 unterschiedlich ausgebildet ist. Der extrazelluläre Teil besteht aus insgesamt 816 Aminosäuren mit vier Fibronektin-Typ-III- und zwei Zytokin-Rezeptor-Domänen (Trp-Ser-X-Ser-Trp) (Heshka and Jones 2001). Die zweite Zytokin-Rezeptor-Domäne übernimmt die Funktion der Leptin-Bindung und der Rezeptor-Aktivierung (Fong et al. 1998). Im nicht-aktivierten Zustand ist die extrazelluläre Domäne ein Homodimer, welches seine Konformation nach Bindung von Leptin ändert (Devos et al. 1997). Die intrazelluläre Domäne ist nur im Ob-Rb-Rezeptor vollständig ausgebildet (306 Aminosäuren). Sie bindet die zyttoplasmatische Janus-Kinase-2 (JAK2, Abb. 6) (Ghilardi and Skoda 1997) und besteht aus einer Prolin-reichen Box-1, welche im Bereich der Aminosäuren 6 bis 17 lokalisiert ist

(Bjorbaek et al. 1997, White et al. 1997) sowie zwei Box-2-Motiven im Bereich der Aminosäuren 49 bis 60 und 202 bis 213 (Chua et al. 1997). Box-1 und eine Box-2 sind für die Bindung von JAK2 (1.6.2.1.) verantwortlich, wobei aber nur Box-1 in der Lage ist, die JAK2 zu aktivieren (Bahrenberg et al. 2002, Kloeck et al. 2002). Zur Induktion des STAT- („signal transducer and activator of transcription“)-Signalweges sind zwei Aminosäuren (Leu (Leucin) 896 und Phe (Phenylalanin) 897) sowie ein Box-2-Motiv notwendig. Diese sind bei allen Wirbeltieren identisch (Murakami et al. 1997, Bahrenberg et al. 2002). Für die weitere Signalweiterleitung spielen zwei Tyrosinreste (auf Position 985 und 1138) eine wichtige Rolle. Sie stellen Bindungsstellen für die nachfolgenden Signalmoleküle zur Verfügung (Banks et al. 2000). Somit ist der Ob-Rb-Rezeptor im Hinblick auf die STAT-Signalkaskade der einzige funktionelle Subtyp der Leptin-Rezeptoren. Er ist vor allem im *Hypothalamus* lokalisiert, kommt aber auch in zahlreichen peripheren Organen und Zelltypen vor (Sweeney 2002, Hegyi et al. 2004).

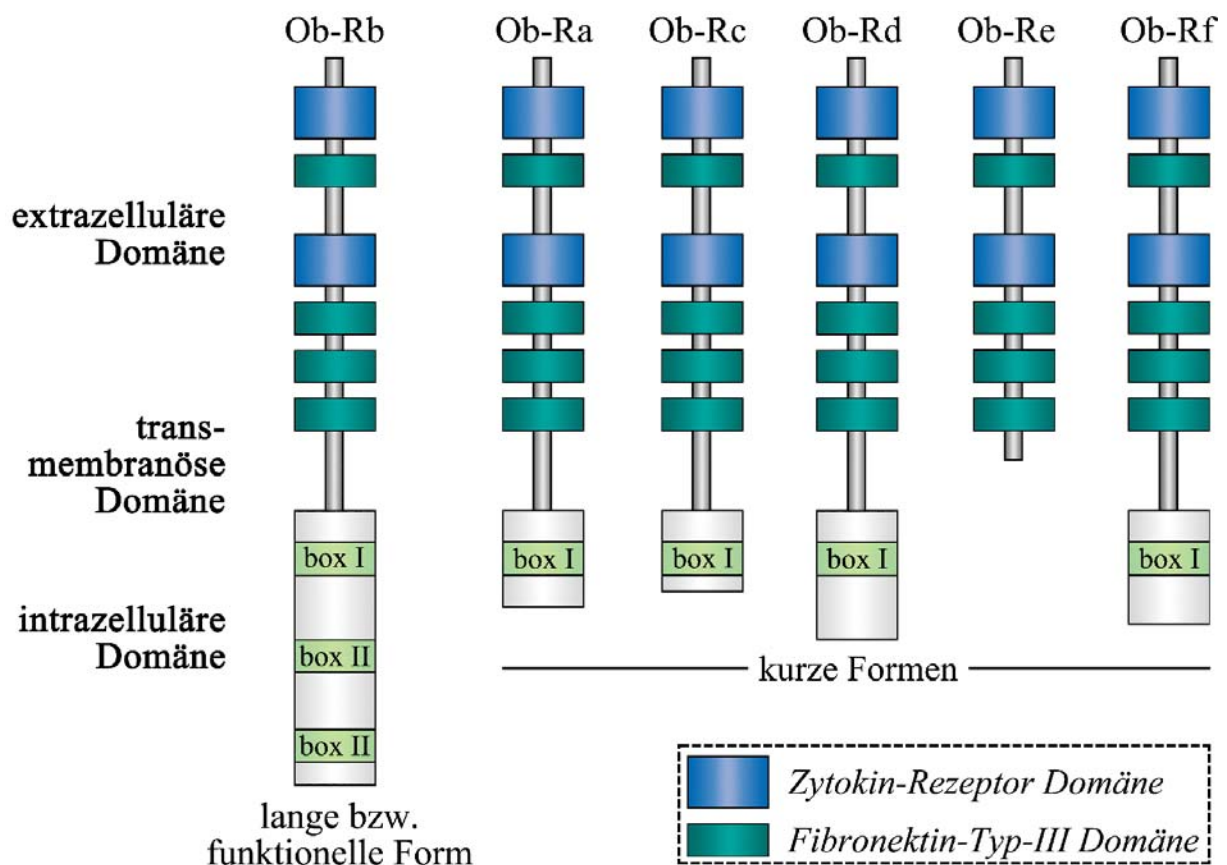


Abb. 5

Die verschiedenen Leptin-Rezeptorisoformen mit ihren extra-, intra- und transmembranösen Domänen. Die lange Form Ob-Rb besitzt als einzige Form eine vollständige intrazelluläre Domäne, die in der Lage ist, die JAK-STAT-Signalkaskade (1.6.2.1.) zu induzieren. Modifiziert Abbildung nach Hegyi et al. (2004).

Die kürzeste Form (Ob-Re), die weder eine transmembranöse noch eine intrazelluläre Domäne besitzt, zirkuliert als löslicher Rezeptor im Blut und übernimmt die Rolle des Leptin-Transportmoleküls (1.4.) (Houseknecht et al. 1996, Lammert et al. 2001). Die übrigen kurzen Formen (Ob-Ra, -Rc, -Rd und -Rf) sind Membran-gebundene Rezeptoren, deren hauptsächliche Aufgabe in der Aufnahme von Leptin aus dem Blut ins Gewebe sowie der Elimination von Leptin besteht (Uotani et al. 1999, Hileman et al. 2000, Hileman et al. 2002). Der Subtyp Ob-Ra kommt ubiquitär vor und ist der Hauptvertreter in den peripheren Geweben (Leclercq-Meyer et al. 1996, Fei et al. 1997). Alle anderen Isoformen spielen eine untergeordnete Rolle und sind nur in geringer und inkonsistenter Ausprägung vertreten (Fei et al. 1997). Nach der Bindung von Leptin an die Rezeptoren kommt es zu einer Aufnahme des Komplexes in sogenannte „frühe Endosomen“ (Internalisierung), in welchen die Rezeptoren entweder abgebaut oder zum Einbau in die Zelloberfläche wiederverwertet werden. Der größte Anteil aller Leptin-Rezeptoren liegt in solchen Endosomen vor, nur etwa 5-25% sind Membran-assoziiert (Barr et al. 1999). Diese Rezeptor-Internalisierung wird durch die Aminosäuren 8 bis 29 reguliert und ist am deutlichsten beim Ob-Rb-Subtypen ausgeprägt (Barr et al. 1999, Uotani et al. 1999). Ebenso dauert der Recycling-Vorgang für den langen Rezeptor am längsten (Lundin et al. 2000).

### ***1.6.2. Signalkaskade und Gentranskription***

Leptin kann seine Effekte über verschiedenste Signalwege auslösen (Sweeney 2002). Im *Hypothalamus* scheint der wichtigste Signalweg die JAK-STAT-Kaskade zu sein, welche gesondert besprochen werden soll (1.6.2.1.). Ein zweiter Weg zur Signalübertragung im *Hypothalamus* ist der Phosphoinositol-3-(PI-3)-Kinase-Signalweg (Niswender et al. 2001, Zhao et al. 2002), der neben Leptin auch durch Wachstumsfaktoren und Insulin stimuliert werden kann. Dieser Weg stellt eine Verbindung zwischen Protein-Kinase-abhängigen und Fett-abhängigen Kaskaden dar (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999). Nach der Bindung des Liganden am Rezeptor kommt es in manchen Zelltypen zu einer Phosphorylierung der „insulin-receptor-substrates“ (IRS-Proteine) und dadurch zur Aktivierung der PI-3-Kinase. Der häufigste Weg zur Aktivierung der PI-3-Kinase geht über die Phosphorylierung der JAK2, welche daraufhin neben der Aktivierung der STAT-Faktoren ebenfalls in der Lage ist, die PI-3-Kinase-Aktivität zu stimulieren (Sweeney 2002). Eine Leptin-induzierte PI-3-Kinase-Aktivität resultiert in einer Aktivierung der Phosphodiesterase-(PDE)3B-Aktivität und damit einer Reduktion des cAMP (Zhao et al. 1998, Zhao et al. 2000, Sahu 2004). PDE3B konnte neben vielen peripheren Geweben auch im zentralen Nervensystem einschließlich den

hypothalamischen Kerngebieten ARC, VMH, *Nucleus hypothalamicus dorsomedialis* (DMH), *Area laterale hypothalami* (LH), *Nucleus paraventricularis* (PaV) und der *Area hypothalami perifornica* nachgewiesen werden (Reinhardt et al. 1995, Niswender et al. 2003, Sahu 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass der PI-3-Kinase-Weg mit dem JAK2-STAT3-Signalweg interagiert, da eine Hemmung von PDE3B eine Verminderung der STAT3-Aktivität nach sich zieht (Meister 2000).

Ein dritter möglicher Signalweg im *Hypothalamus* ist der MAPK/ERK- („mitogen-activated protein kinase“/ „extracellular signal regulated kinase“)-pathway (Banks et al. 2000, Bjorbaek et al. 2001). Aufgrund der Tatsache, dass ERK eine Ob-Rb-induzierte c-fos Genexpression (1.11.) hervorruft (Banks et al. 2000) und sowohl zentral als auch peripher appliziertes Leptin in der Lage ist, c-fos im *Hypothalamus* zu induzieren (Van Dijk et al. 1996, Elias et al. 1998a, Elmquist et al. 1998b, Yokosuka et al. 1998), kann auf eine gewisse Bedeutung dieses Signalweges bei der Leptin-vermittelten Signalübertragung geschlossen werden.

In dieser Arbeit soll das Augenmerk auf die JAK-STAT-Kaskade gerichtet werden, die eine Schlüsselfunktion bei der Signalübermittlung im *Hypothalamus* für die Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase einzunehmen scheint.

#### **1.6.2.1. JAK-STAT-Kaskade**

Ein wichtiger Hauptsignalweg für Leptin ist die JAK-STAT-Kaskade (Abb. 6). Diese Signalkaskade stellt eine Signalübermittlung von der Zellmembran zum Zellkern dar. Die proximale Region der intrazellulären Domäne des Ob-Rb (1.6.1.) ist mit Tyrosin-Kinasen (Janus-Kinasen) assoziiert (Heim 1996), die für die Signaltransduktion von wichtiger Bedeutung sind. Die Familie der JAKs repräsentiert eine Gruppe löslicher Tyrosin-Kinasen, die für die Signaltransduktion verschiedener Zytokine verantwortlich gemacht wird. Zu der Familie der JAKs gehören JAK1, -2, -3 und Tyrosin-Kinase-2 (TYK2). Sie haben ein Molekulargewicht von 125-135kDa und eine Länge von etwa 1000 Aminosäuren. Mit dem Leptin-Rezeptor sind allerdings nur JAK1 und -2 assoziiert (Bjorbaek et al. 1997), wobei JAK2 eine wesentliche Rolle bei der Signalübermittlung von Leptin einnimmt (Kloek et al. 2002). In ruhenden Zellen sind die JAKs katalytisch inaktiv. Die Interaktion von Leptin mit seiner Membran-gebundenen Zytokin-Rezeptor-Domäne induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, so dass es zur Annäherung der assoziierten JAKs und damit einerseits zur gegenseitigen Transphosphorylierung der JAKs selbst und andererseits zur Phosphorylierung von Tyrosinresten am Rezeptor (Tyr 985, 1077 und 1138) kommt (Eyckerman et al. 1999, Banks et al. 2000).

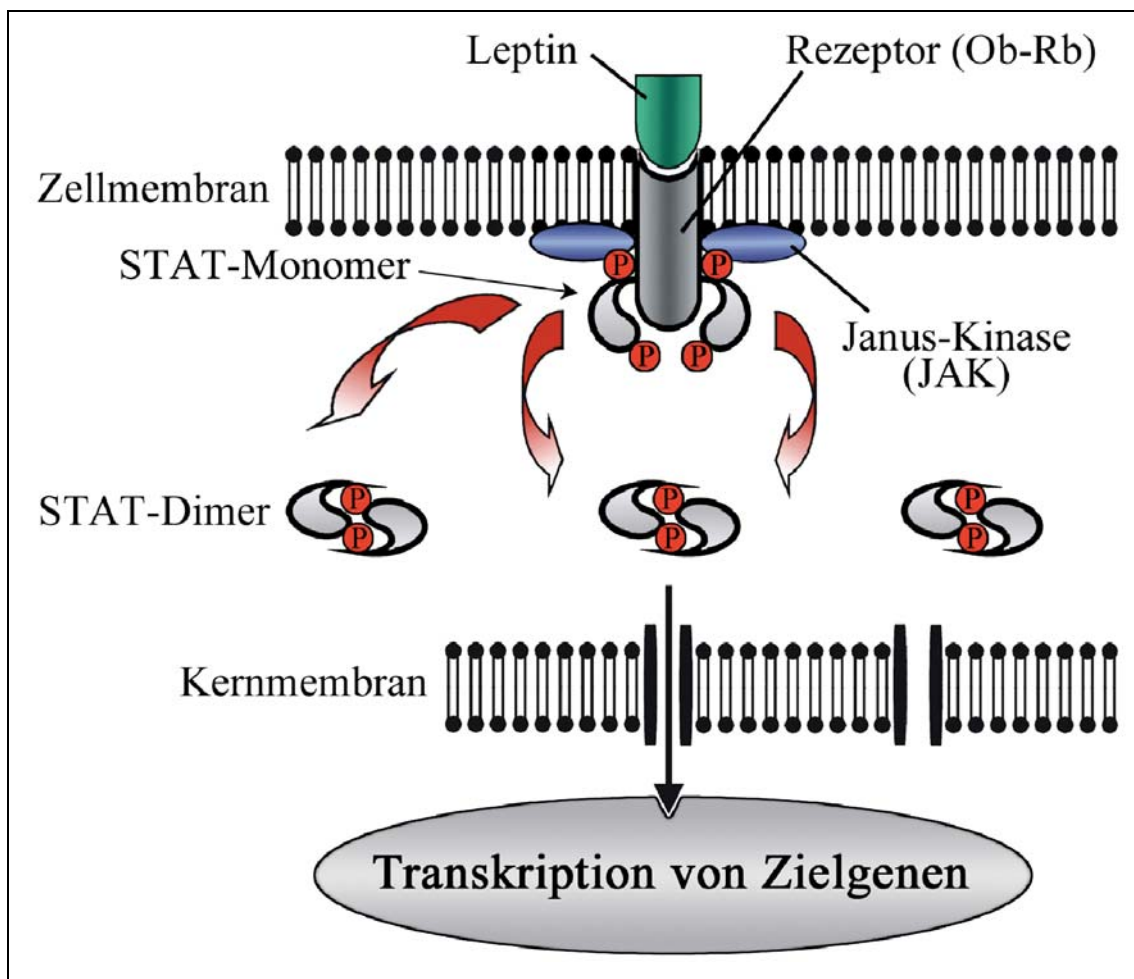


Abb. 6

**Darstellung der JAK-STAT-Signalkaskade. Der Rezeptor-stimulierende Ligand (Leptin) bindet am membranständigen Rezeptor und aktiviert somit die Janus-Kinase. Daraufhin dissoziieren die STAT-Monomere und schließen sich zu Dimeren zusammen, welche anschließend in den Zellkern wandern und dort die Transkription von Zielgenen regulieren. STAT = „signal transducer and activator of transcription“. Modifiziertes Schema (Hübschle 2004).**

Diese phosphorylierten Tyrosinreste sind Bindungsstellen für besondere Transkriptionsfaktoren, die STATs, welche sich durch ihre zweifache Funktion einerseits der Signaltransduktion im Zytoplasma und andererseits der Aktivierung der Transkription im Zellkern auszeichnen. Für die Aktivierung von STAT5 ist Tyr 1077 zusammen mit Tyr 1138 und für die Aktivierung von STAT3 ist allein Tyr 1138 essentiell. Die STAT-Faktoren, durch Studien über die Signalvermittlung der Interferone erstmalig identifiziert (Darnell Jr. et al. 1994), bilden eine Gruppe von bislang sieben Proteinen (STAT1, -2, -3, -4, -5a und -5b sowie -6). Mit einer Länge von ca. 750 bis 850 Aminosäuren besitzen sie abschnittsweise ähnliche Strukturen (Darnell Jr. et al. 1994) und eine Sequenzhomologie von 28-50%. Mit über 50% weist die Sequenz zwischen der Aminosäure 600 und 700 eine maximale Übereinstimmung auf. Diese Region kodiert den Bereich der SH-2-Domäne. Die SH-2-Domäne assoziiert mit

dem Rezeptor-Kinase-Komplex und legt fest, welches STAT-Molekül von welchem Rezeptor gebunden wird (Overduin et al. 1992, Heim et al. 1995). Im Falle des Leptin-Rezeptors wird vor allem STAT3 aber auch STAT1, STAT5 und STAT6 durch Leptin aktiviert (Ghilardi et al. 1996, Bendinelli et al. 2000, Tsumanuma et al. 2000, Goiot et al. 2001, Sanchez-Margalet and Martin-Romero 2001). In einem weiteren Schritt werden die STAT-Moleküle durch Phosphorylierung ihres Tyrosinrestes durch die JAKs aktiviert (Heim 1996). Die transiente Assoziation der STAT-SH-2-Domäne mit dem Rezeptor-Kinase-Komplex bringt die STAT-Monomere in eine angemessene Position, um von den benachbarten JAKs durch Phosphorylierung des Tyrosinrestes aktiviert zu werden. Der Rezeptor scheint dabei bestimmen zu können, welches STAT-Monomer assoziiert wird, indem er die einzigartigen Besonderheiten der STAT-SH-2-Domäne erkennt. Damit agiert der Rezeptor als zentrale Stelle, um die Signalgenauigkeit zu gewährleisten und zu regulieren (Schindler and Darnell Jr. 1995). Nach der Aktivierung dissoziieren die STAT-Monomere von der intrazellulären Domäne. Daraufhin sind die freien Monomere in der Lage mit anderen aktivierten STAT-Monomeren Homo- bzw. Heterodimere zu bilden. Die Dimerisierung erfolgt durch molekulare Interaktion der SH-2-Domänen mit den phosphorylierten Tyrosinresten (O'Shea et al. 2002). Dabei kann es zur Bildung von Homodimeren durch zwei gleiche oder zu Heterodimeren durch zwei unterschiedliche STAT-Faktoren kommen. Im direkten Anschluss werden die STAT-Dimere Serin-phosphoryliert und wandern in den Zellkern, um sequenzabhängig an DNA-Strukturen („responsive elements“) am Promotor ihrer Zielgene zu binden. Bei solchen DNA-Strukturen kann es sich um „sis-inducible-elements“ (SIE), „acute-phase-response-elements“ (APRE) und andere GAS-ähnliche Elemente ( $\gamma$ -aktivierende Sequenz) handeln (Baumann et al. 1996, Heim 1996, Bendinelli et al. 2000). Für einen Teil dieser nukleären Translokation wurde ein Rezeptor-vermittelter, endozytotischer, Vesikel-betriebener Transport der STAT-Dimere von der Zellwand-nahen Region der Aktivierung in eine perinukleäre Region beschrieben (Bild et al. 2002). Für eine einfache Passage durch die Nukleoporen sind die STAT-Moleküle allerdings zu groß. Sie müssen also aktiv in den Kern eingeschleust werden. Prinzipiell scheint es zumindest auch einen permanenten Im- und Export von STATs in Zellkerne zu geben. So sind beispielsweise auch nicht-phosphorylierte STAT-Moleküle immer im Kern zu finden (Meyer et al. 2002). Diese werden als Koaktivatoren der eigentlichen phosphorylierten Dimere angesehen (Chatterjee-Kishore et al. 2000). Potenzielle nukleäre Im- oder Exportsignale wurden allerdings bisher nur zum Teil identifiziert. Für den Transport von STATs in den Zellkern sind spezifische nukleäre Import-Rezeptoren (Importin- $\alpha$ 5 und Ran) verantwortlich (McBride et al. 2002). Für STAT3 wurde

erst kürzlich der Export über spezifische NES-(„nuclear export signal“)-Elemente beschrieben (Bhattacharya and Schindler 2003). Bei Rezeptoraktivierung akkumulieren phosphorylierte STAT-Moleküle im Kern durch eine schnelle Translokation. Anschließend werden sie dephosphoryliert, wieder zügig in das Zytoplasma exportiert (Haspel and Darnell Jr. 1999) und können dort wieder verwendet werden (Bhattacharya and Schindler 2003).

Der Leptin-induzierte JAK-STAT-Signalweg im *Hypothalamus* kann durch verschiedene Faktoren gehemmt werden. So können sogenannte „suppressors of cytokine signalling“ (SOCS) die Tyrosin-Bindungsstellen entweder an Signalmolekülen (z.B. JAK2) oder am Ob-Rezeptor selbst (Tyr 985 und 1138) besetzen. Von ihnen existieren acht unterschiedliche Subtypen SOCS-1 bis -7 und ein Zytokin-induzierbares SH-2-Protein (CIS). Die Synthese von CIS und SOCS-1 bis -3 wird durch Zytokine über den JAK-STAT-Signalweg induziert, was im Falle von SOCS-4 bis -7 noch nicht bestätigt werden konnte (Larsen and Ropke 2002). Über diesen Feedback-Mechanismus wird also die Wirkung eines Zytokins unter anderem reguliert. Im Falle von Leptin wird die Synthese von SOCS-3 stimuliert, welches anschließend an phosphorylierte Tyrosinreste der JAK2 bindet und einerseits deren Auto-Phosphorylierung sowie andererseits die Phosphorylierung des Rezeptors (Ob-Rb) verhindert, so dass STAT-Monomere nicht mehr am Rezeptor binden können (Endo et al. 1997, Starr et al. 1997, Hansen et al. 1999). Die Leptin-induzierte Synthese von SOCS-3 spielt somit eine wichtige Rolle in der Leptin-Resistenz bei Adipositas (1.8.) (Bjorbaek et al. 1999). Ein weiteres Protein, welches die Leptin-induzierte JAK-STAT-Kaskade hemmen kann, ist die Protein-Tyrosin-Phosphatase-1B (PTP-1B). Dieses Protein bindet an einer spezifischen Bindungsstelle der JAK2 und dephosphoryliert diese. PTP-1B-Knockout-Mäuse haben eine erhöhte Leptin-Sensitivität mit einer gesteigerten STAT3-Phosphorylierung und vermehrtem Gewichtsverlust (Cheng et al. 2002, Kaszubska et al. 2002, Zabolotny et al. 2002). Als dritte hemmende Faktoren des Leptin-induzierten JAK-STAT-Signalweges wurden „protein-inhibitors of activated STAT“ (PIAS) identifiziert. Diese Proteine sind in der Lage, die Bindung von STAT3-Dimeren an der DNA zu verhindern. In dieser Familie sind bisher vier Proteine bekannt (PIAS1, -3, -x und -y), welche STAT1 (PIAS1), STAT3 sowie STAT5 (PIAS-3) und STAT4 spezifisch hemmen können (Chung et al. 1997, Liu et al. 2001, Ryczczyn and Clevenger 2002, Arora et al. 2003).

#### **1.6.2.1.1. STAT3**

Leptin scheint seine Effekte im *Hypothalamus* allein durch die Aktivierung von STAT3 zu vermitteln (Vaisse et al. 1996, Meister 2000). STAT3 besitzt eine Länge von 770



Aminosäuren, sein Gen wurde auf dem Chromosom 11 der Maus entdeckt (Shi et al. 1996). Es ist sehr stark homolog zu STAT1 und beinhaltet die gleiche, am C-terminalen Ende lokalisierte, Serin-Phosphorylierungsstelle (Ser 727) (Wen et al. 1995). Seine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle befindet sich auf Position 705 (Grimley et al. 1999). STAT3 kann nicht nur über den Leptin-Rezeptor sondern auch durch andere Zytokin- bzw. Hormon-Rezeptoren aktiviert werden. Dies sind vor allem Rezeptoren von z.B. Prolaktin, GH, Erythropoetin, Thrombopoetin, G-CSF, IL-2, -3, -6, -9 und -10 bis -12, ziliärer neurotrophischer Faktor (CNTF), LIF sowie Interferon-(IFN)- $\alpha$  und - $\beta$  (Grimley et al. 1999) und TNF- $\alpha$  (Rizk et al. 2001). Eine Aktivierung von STAT3 durch Leptin resultiert in einer Zelltyp-abhängigen Gentranskription. Durch eine Blockade der JAK2-STAT3-Kaskade (s/s-Mäuse, bei denen eine Mutation des Tyr 1138 vorliegt, so dass STAT3 nicht mehr am Rezeptor binden kann) konnte neben Hyperphagie und erhöhtem Energieverbrauch auch ein erhöhter Glucocorticoid- und erniedrigter Spiegel der Schilddrüsenhormone festgestellt werden, wobei aber keine Veränderung in der hypothalamischen Kontrolle der Gonaden und des Wachstums zu vermerken war (Bates and Myers 2004). Somit spielt der Leptin-induzierte JAK2-STAT3-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der hypothalamischen Regulation der Energie-Homöostase sowie der Schilddrüsen- und Nebennierenfunktion (1.9.3.). Bisher konnte nach zentraler Leptin-Applikation im *Hypothalamus* der Ratte vor allem im ARC, VMH, DMH und in geringerer Konzentration im *Nucleus periventricularis* (Pe) und in der LH (1.10.) eine nukleäre STAT3-Aktivierung dokumentiert werden (Hübschle et al. 2001, Ladyman and Grattan 2004). Im PaV, Pe, LH und ARC tragen diese STAT3-positiven Zellen ebenfalls Leptin-Rezeptoren (Hakansson and Meister 1998). Nach systemischer Leptin-Applikation konnte im *Hypothalamus* der Maus im ARC, VMH, DMH, PMV und in der LH (Hosoi et al. 2002, Münzberg et al. 2004) sowie in der Ratte im ARC, VMH, DMH, PaV, LH, *Nucleus tractus solitarius* (Sol) und *Nucleus vagus dorsomotorius* (MNV) (Münzberg et al. 2003) eine Leptin-induzierte STAT3-Translokation nachgewiesen werden.

#### **1.6.2.1.2. STAT5**

STAT5 wurde zuerst als ein Prolaktin-induzierter Faktor der Milchdrüse (MGF) identifiziert (Gouilleux et al. 1994). Es gibt zwei sehr homologe Isoformen (95%) des STAT5-Transkriptionsfaktors (STAT5a und -b), die auf zwei hintereinander geschalteten Genen des Chromosoms 17 kodiert sind. Ihre Länge beträgt 793 (STAT5a) und 786 Aminosäuren (STAT5b) (Buitenhuis et al. 2004). Die Phosphorylierungsstellen befinden sich bei STAT5a für Serin auf Position 725 und für Tyrosin auf 694, bei STAT5b für Serin auf 730 und für

Tyrosin auf Position 699 (Grimley et al. 1999). Sie werden neben Leptin-Rezeptoren auch durch Rezeptoren anderer Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert, dazu zählen Zytokine der Klasse-I- und der Klasse-II-Superfamilie wie z.B. Prolaktin, GH, Erythropoetin, Thrombopoetin, G-CSF, IL-2 bis -7, -9 bis -13 und -15, CNTF, LIF sowie IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  (Grimley et al. 1999) und TNF $\alpha$  (Rizk et al. 2001). Die durch JAKs Tyrosin-phosphorylierten STAT5-Faktoren dimerisieren und wandern in den Zellkern, wo sie Zelltypen-spezifisch Gene aktivieren (1.6.2.1.), wie z.B. Zellzyklus-regulatorische Gene von hämatopoetischen Zellen, Anti-Apoptose Gene oder Gene zur Zelldifferenzierung sowie zur Milchbildung (Buitenhuis et al. 2004, Paukku and Silvennoinen 2004). STAT5a-Knockout-Mäuse zeigen eine fehlende Laktation (weibliche) sowie Defekte in der T-Zell- und NK-Zell-Proliferation, wohingegen STAT5b-Knockout-Mäuse eine gestörte Entwicklung und männliche Tiere auch ein gestörtes Wachstum aufweisen. Mäuse, bei denen sowohl STAT5a als auch STAT5b ausgeschaltet sind, reagieren mit geringerem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, und weibliche Individuen sind infertil (Liu et al. 1997, Udy et al. 1997, Teglund et al. 1998, Levy and Gilliland 2000). Ebenso weisen sie eine verminderte Zahl an Lymphozyten, Myelozyten und Erythrozyten auf (Bunting et al. 2002). Somit scheinen sich die Hauptfunktionen von STAT5a und -b auf das Körperwachstum, die Entwicklung der Milchdrüse, die Reproduktion und das Immunsystem zu konzentrieren. Bisher konnte eine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Expression nur in Zellen aus peripheren Geweben, z.B. dem Epithel des *Jejunums* bei Mäusen sowie in humanen Dünndarm-Epithelzellen, in der *Mucosa* des Magens und in der Leber von Ratten sowie in einer Ratten-Insulinoma-Zelllinie nachgewiesen werden (Morton et al. 1998, Briscoe et al. 2001, Goiot et al. 2001, Carvalheira et al. 2003). Sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem hingegen konnte noch keine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Expression gezeigt werden. Es gibt lediglich Hinweise auf eine Prolaktin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation, welche in dopaminergen Neuronen hypothalamischer Kerngebiete (ME, PE sowie im dorsalen und rostralen Anteil des ARC) gefunden wurde (Grattan et al. 2001, Lerant et al. 2001). Weiterhin konnte eine TNF $\alpha$ -induzierte STAT5-Phosphorylierung im *Hypothalamus* der Ratte (Rizk et al. 2001), eine IL-3-induzierte STAT5-Tyrosinphosphorylierung in kultivierten Mikroglia-Zellen (Natarajan et al. 2004) und eine GH-induzierte STAT5-Phosphorylierung in GH4-Hypophysen-Zellen (Liu et al. 2002) nachgewiesen werden.

### 1.7. Abbau und Elimination

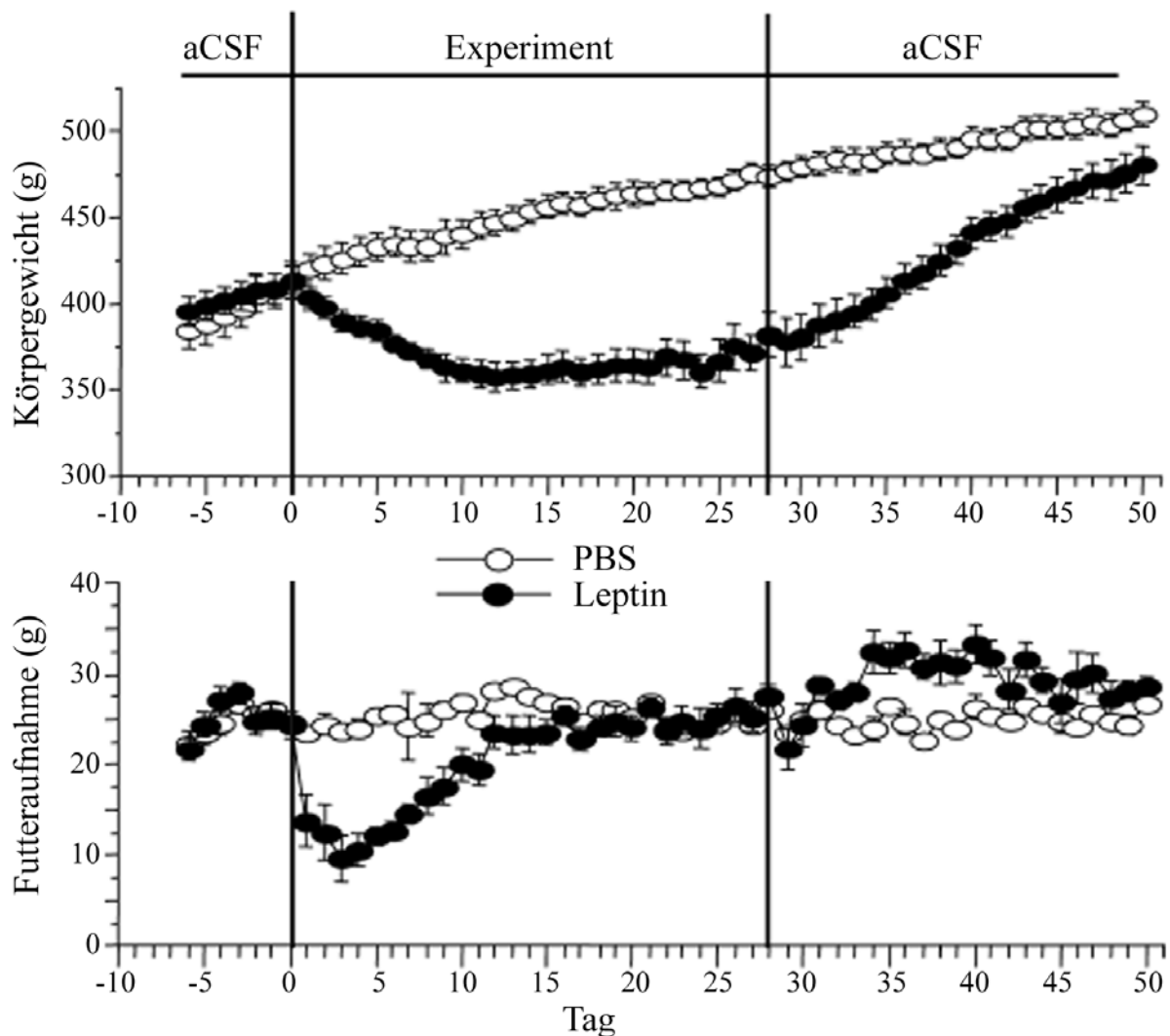
Leptin hat eine sehr kurze Halbwertszeit in der Zirkulation. Der Hauptweg der Leptin-Elimination geht über die glomeruläre Filtration und die Sekretion über renale Tubulus-Epithelzellen als intaktes Protein (Cumin et al. 1996, Meyer et al. 1997, Hill et al. 1998). Das glomeruläre Endothel lässt Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu 50kDa passieren, wobei Moleküle zwischen 15 und 17kDa nahezu ungehindert filtriert werden können. Jedoch können saure und damit negativ geladene Proteine, wie Leptin, den glomerulären Filter nicht ohne weiteres überwinden (Chang et al. 1975, Zhang et al. 1994). Zusätzlich existiert in der Niere ein nicht sättigbares Transport-System mit einer hohen Bindungs-Kapazität, das vor allem durch die kurzen Formen der Leptin-Rezeptoren, die in einer hohen Dichte in den Nieren vorkommen, verwirklicht wird. Diese Rezeptoren, besonders Ob-Ra, übernehmen die Funktion der Internalisierung und des Abbaus von Leptin (1.6.1.) (Tartaglia et al. 1995, Cumin et al. 1997b, Cumin et al. 1997a, Uotani et al. 1999).

### 1.8. Das Problem der Leptin-Resistenz

Die hypothalamisch vermittelte Wirkung von Leptin auf den Energiehaushalt bezieht sich in erster Linie auf die Reduktion der Nahrungsaufnahme und die Erhöhung des Energieverbrauchs durch gesteigerte Thermogenese und Erhöhung der metabolischen Rate. So bewirkt die Applikation von rekombinantem Leptin bei ob/ob-Mäusen, welche Leptin-defizient sind, eine Reduktion der Nahrungsaufnahme sowie der Körpermasse durch Abbau der Fettdepots. Die Effekte einer zentralen Leptin-Infusion auf die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht von Ratten sind in Abb. 7 graphisch dargestellt. Während einer vierwöchigen i.c.v.-Leptin-Infusion kam es zu einer deutlichen Reduktion des Körpergewichts, wohingegen sich die Nahrungsaufnahme nach einer anfänglichen Reduktion wieder schnell normalisierte. Nach dem Abbruch der Leptin-Infusion kam es zu einer langsamen Normalisierung des Körpergewichts und zu einer mehrere Tage andauernden *Hyperphagie*. Die relativ schnelle Normalisierung der Nahrungsaufnahme noch während der zentralen Leptin-Infusion ist Ausdruck einer sich einstellenden Resistenz gegenüber der sättigenden Wirkung von Leptin. Der Mechanismus für das anhaltende reduzierte Körpergewicht bei normaler Nahrungsaufnahme ist noch unklar.

Leptin wurde von vielen Wissenschaftlern als ein „Anti-Fettsucht-Hormon“ bezeichnet (Campfield et al. 1995, Halaas et al. 1995, Pelleymounter et al. 1995b). Trotzdem konnten

gerade bei stark adipösen Menschen sehr hohe Leptin-Konzentrationen im Blut gemessen werden, ohne dass erhöhte Leptin-Spiegel im Plasma einen Effekt auf die Körpermasse oder die Nahrungsaufnahme gehabt hätten (Maffei et al. 1995, Considine et al. 1996, Schwartz et al. 1996b). Dieser Befund führte zur Hypothese der Leptin-Resistenz (Campfield et al. 1997, Campfield and Smith 1998). Diesem Modell zufolge kann Leptin seine Wirkung nur bis zu einer bestimmten Konzentration entfalten, über diesen Punkt hinaus stellt sich eine Insensitivität (Resistenz) ein.



**Abb. 7**

**Effekt einer chronischen, zentralen Leptin-Infusion auf das Körpergewicht (oben) und die Futtermittelaufnahme (unten) bei Ratten. Nach einer sieben-tägigen Infusion von künstlicher Zerebrospinal-Flüssigkeit (aCSF, 1 $\mu$ l/h) folgte eine 28-tägige Infusion mit rekombinantem murinem Leptin (160ng/h) oder Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) und anschließend wieder eine drei-wöchige Infusion mit aCSF. Modifizierte Abbildung nach Sahu (2003).**

Eine Hypothese zu Mechanismen der Leptin-Resistenz bei Adipositas bezieht sich auf einen verminderten Transport von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke (1.5.1.) ins ZNS. Es konnte

gezeigt werden, dass der Liquor-Plasma-Leptin-Quotient in adipösen höher als in mageren Individuen war (Caro et al. 1996, Schwartz et al. 1996b). Zudem induzierte eine periphere Leptin-Applikation in hyperleptinämischen Mäusen mit diät-induzierter Fettleibigkeit (DIO-Tiere) keine Effekte auf die Futteraufnahme und das Körpergewicht, wohingegen eine zentrale Applikation von Leptin sehr wohl zu einer Abnahme der Futteraufnahme und des Körpergewichts führte (Van Heek et al. 1997). Weiterhin konnte keine STAT3-Aktivierung nach peripherer, wohl aber nach zentraler Leptin-Applikation im *Hypothalamus* von DIO-Mäusen induziert werden (El-Haschimi et al. 2000), und schließlich war der Leptin-Transport über die Blut-Hirn-Schranke in verschiedenen Tier-Modellen mit Fettleibigkeit deutlich vermindert (Burguera et al. 2000, Banks 2001).

Eine zweite Hypothese zu Mechanismen der Leptin-Resistenz bezieht sich auf die Regulation und Expression der Leptin-Rezeptoren. Die Expression von Ob-Rb wird durch den Ernährungszustand beeinflusst. So stimuliert Hungern die Ob-Rb-Gen-Expression (Baskin et al. 1998, Sahu et al. 2002) und die Bindung von Leptin im *Hypothalamus* (Baskin et al. 1999b). Ebenso konnten verminderte Leptin-Rezeptor-Protein-Spiegel und ein gehemmter STAT3-Signalweg in DIO-Tieren nach systemischer Leptin-Applikation beobachtet werden (El-Haschimi et al. 2000, Madiehe et al. 2000). Im Gegensatz dazu ist die Leptin-Rezeptor-mRNA im *Hypothalamus* adipöser ob/ob- und db/db-Mäusen erhöht (Huang et al. 1997, Baskin et al. 1998). Folglich bewirken hohe Leptin-Spiegel im *Hypothalamus* eine Verminderung der Leptin-Rezeptor-mRNA-Expression und umgekehrt.

Eine dritte Hypothese zu Mechanismen der Leptin-Resistenz bezieht sich auf einen defekten STAT3-Signalweg im *Hypothalamus* adipöser Tiere. In DIO-Mäusen konnte eine reduzierte STAT3-Aktivierung nach systemischer Leptin-Applikation beobachtet werden (El-Haschimi et al. 2000). Es ist allerdings noch nicht klar, ob auch eine defekte Rezeptor-Phosphorylierung und/oder JAK2-Aktivierung dabei eine Rolle spielten (El-Haschimi et al. 2000, Sahu et al. 2002). Weiterhin kommt es durch eine Leptin-induzierte Aktivierung von STAT3 zu einer vermehrten Synthese inhibitorischer Faktoren, welche in einem autoregulatorischen Feedback-Mechanismus die Leptin-vermittelte Signalkaskade hemmen. Dies sind z.B. SOCS-3, PIAS-3, PTP-1B oder SHP-2 (1.6.2.1.) (Bjorbaek et al. 1998a, Carpenter et al. 1998, Bjorbaek et al. 1999).

## 1.9. Leptin-vermittelte Wirkungen auf den Organismus

Leptin entfaltet seine Wirkung in vielen unterschiedlichen Organsystemen und interagiert mit zahlreichen Hormonen. Dies macht eine detaillierte Beschreibung aller Leptin-vermittelten Wirkungen sehr umfangreich. Einen Überblick der bislang beschriebenen Wirkungen, die durch Leptin vermittelt werden, zeigt Abb. 8. In dieser Arbeit soll das Hauptaugenmerk auf seine zentralnervös-, insbesondere auf seine hypothalamisch-vermittelte Wirkung gerichtet werden. Die wichtigsten hypothalamisch-vermittelten Effekte von Leptin sind einerseits die Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes durch Regulation der Nahrungsaufnahme, des Energieverbrauchs und Erhöhung der metabolischen Rate sowie die neuroendokrine Regulation. Im Rahmen der hypothalamisch-vermittelten Regulation dieser Funktionen interagiert Leptin mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Systemen, die im folgenden vorgestellt werden sollen. Dies zeigt sehr deutlich die multifaktorielle Natur und den komplexen Aufbau der Leptin-gesteuerten Prozesse.

|   |   |
|---|---|
| <b>Leptin</b> <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="text-align: right; margin-right: 10px;"> <b>zentrale<br/>Wirkung</b> </div> <div style="font-size: 2em;">             ↗<br/>↘           </div> <div style="text-align: left; margin-left: 10px;"> <b>periphere<br/>Wirkung</b> </div> </div> | <b>Hypothalamus</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nahrungsaufnahme und Energie-Homöostase</li> <li>2. Wirkung auf das autonome Nervensystem</li> <li>3. neuroendokrine Funktionen               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reproduktion</li> <li>• Glucocorticoid-Spiegel</li> <li>• Schilddrüsenfunktion</li> <li>• Wachstum</li> <li>• Insulinsensitivität</li> </ul> </li> </ol>   |
|   | <b>Leber</b> Insulin-Wirkung<br><b>Niere</b> Exkretion und Reabsorption<br><b>Pankreas</b> Insulin-, UCP-2-Sekretion, Oxidation<br><b>Uterus</b> Wachstum und Metabolismus des Fetus<br><b>Milchdrüse</b> neonatale Futteraufnahme<br><b>Blut</b> Hämatopoese, Angiogenese, Immunsuppression, Glukose-Homöostase, Lipogenese und Fettoxidation<br><b>Darm</b> Zucker-Absorption und Motilität<br><b>BFG</b> UCP-1-Sekretion und Thermogenese<br><b>WFG</b> UCP-2- und -3-Sekretion, Insulin-Wirkung und lipolytische Aktivität<br><b>Skelettmuskel</b> UCP-3-Sekretion, Glycogen-Synthese, Glukose-Transport und Fettverteilung |

**Abb. 8**  
**Darstellung der zentralen und peripheren Wirkungen und Interaktionen von Leptin.**  
 UCP = „uncoupling protein“; BFG = braunes Fettgewebe und WFG = weißes Fettgewebe.

### 1.9.1. Regulation von hypothalamischen Neurotransmittern und Neuropeptiden

| orexigene Peptide                       | anorexigene Peptide  |
|---|--|
| Agouti-verwandtes Peptid (AgRP)         | $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) |
| $\beta$ -Endorphin                      | Neurotrophischer Faktor des Gehirns (BDNF)                   |
| Dynorphine                              | Bombesin   |
| $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)       | Cholezystokinin  |
| Galanin (GAL)                           | Cocain- und Amphetamin-reguliertes Transkript (CART)         |
| Melanin-konzentrierendes Hormon (MCH)   | Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)                         |
| Neuropeptid-Y (NPY)                     | Dopamin  |
| Noradrenalin (NA)                       | Galanin-ähnliches Peptid (GALP)                              |
| Orexin A und B                          | Glukagon-ähnliches Peptid-1 (GLP-1)                          |
| Peptid YY                               | Insulin (Wirkung über den <i>Hypothalamus</i> )              |
| Serotonin (5-HT, 1A-Rezeptoren)         | Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )                        |
| Wachstumshormon-Releasing-Hormon (GHRH) | Leptin   |
|   | Motilin  |
|   | Neurotensin  |
|   | Oxytocin   |
|   | Proopiomelanocortin (POMC)                                   |
|   | Serotonin (5-HT, 1B- und 2C-Rezeptoren)                      |
|   | Somatostatin   |
|   | Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH)                          |
|   | Urocortin  |

**Tab. 1**

**Auflistung verschiedener regulatorischer Neuropeptide und -transmitter mit Wirkung auf die Nahrungsaufnahme. Linke Spalte: stimulierende Stoffe; rechte Spalte: hemmende Stoffe.**

Die Nahrungsaufnahme wird durch verschiedene Neuropeptide und -transmitter aus dem *Hypothalamus* reguliert (Tab. 1), die wiederum selbst durch Leptin moduliert werden. Leptin hemmt solche Transmitter, die einen orektischen Effekt vermitteln und stimuliert diejenigen, die anorektisch wirken. Die Modulation dieser Neuropeptide und -transmitter und deren orektische bzw. anorektische Wirkung ist z.T. bestimmt durch die Plasma-Konzentration an Leptin. So wird z.B. die Synthese von Neuropeptid-Y (NPY) und Agouti-verwandtem Peptid (AgRP, den Melanocortin-Rezeptor MC<sub>4</sub> hemmendes Neuropeptid) im *Hypothalamus* durch niedrige Leptin-Spiegel (Hungerzustand) stimuliert (Stephens et al. 1995, Schwartz et al. 1996c, Broberger et al. 1998a, Hahn et al. 1998) und durch hohe Plasma-Konzentrationen an Leptin (Adipositas) gehemmt (Ebihara et al. 1999, Mizuno and Mobbs 1999, Ziotopoulou et al. 2000). Im Gegensatz dazu wird die Synthese von Proopiomelanocortin (POMC) und damit von  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendem Hormon ( $\alpha$ -MSH) und CRH durch eine hohe Leptin-Konzentration (Adipositas) stimuliert (Friedman 1997, Schwartz et al. 1997). Ein niedriger Leptin-Spiegel (Hungerzustand) löst ein Verhalten und eine hormonelle sowie metabolische Reaktion aus, die zusammen zu einer positiven Energiebilanz führen, wohingegen eine Gewichtszunahme, einhergehend mit steigender Leptin-Konzentration, zu einer negativen

Energiebilanz führt (Friedman and Halaas 1998). Im Folgenden sollen einige wichtige, in den Energiehaushalt eingreifende Neuropeptide vorgestellt werden.

#### ***1.9.1.1. Das Neuropeptid Y (NPY)***

Das NPY ist eines der am häufigsten vorkommenden Neuropeptide im Gehirn von Säugetieren. Es kann fast überall im zentralen und peripheren Nervensystem nachgewiesen werden und gilt als einer der potentesten Stimulatoren der Nahrungsaufnahme. Seine orektische Wirkung wurde erstmals 1984 beschrieben (Stanley and Leibowitz 1984, Stanley et al. 1986). NPY-synthetisierende Neurone befinden sich im medialen Anteil des ARC (Baskin et al. 1999a) und vermitteln nicht nur eine Regulation der Energie-Homöostase über eine Steigerung der Futteraufnahme, sondern auch eine Verminderung der elektrischen Aktivität sympathischer Efferenzen zum braunen Fettgewebe, was zu einer Abnahme der Wärmeproduktion (1.9.2.) und damit zu einer effizienteren Energiespeicherung führt (Egawa et al. 1991, Billington et al. 1994). Durch eine i.c.v.-Applikation von NPY konnte neben einer gesteigerten Nahrungsaufnahme sowie herabgesetzten Thermogenese auch eine Induktion lipogenetischer Enzyme in der Leber sowie im weißen Fettgewebe und damit verbundener substanzieller Zunahme der Körperfettmasse beobachtet werden (Stanley et al. 1986, Billington et al. 1991, Zarjevski et al. 1993). Der Weg, über welchen Leptin seinen negativen Einfluss auf die NPY-Synthese vermittelt, ist bisher noch unklar. Einerseits gibt es Hinweise darauf, dass über die Aktivierung von STAT3-Faktoren und die darauffolgende Synthese von SOCS-3 die NPY-Synthese gehemmt wird (Hakansson and Meister 1998, Elias et al. 1999, Banks et al. 2000), andererseits aber postulieren einige Autoren eine Leptin-induzierte Hemmung von cAMP über den PI-3-Kinase-Weg (Akabayashi et al. 1994, Shimizu-Albergine et al. 2001). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Leptin die Synthese von NPY in Neuronen des medialen ARC hemmt und damit der orektische und Sympathikus-deaktivierende Effekt von NPY unterdrückt wird.

#### ***1.9.1.2. Das Agouti-verwandte Peptid (AgRP)***

Ein weiteres orexigenes Peptid, welches neben NPY in Neuronen des medialen Anteils des ARC synthetisiert wird (Shutter et al. 1997, Broberger et al. 1998b, Hahn et al. 1998), ist das AgRP. Eine i.c.v.-Applikation dieses Neuropeptids führt zu einer starken Hyperphagie und Gewichtszunahme (Rossi et al. 1998, Wilson et al. 1999, Hagan et al. 2000). Es wirkt über Melanocortin-3- und -4-Rezeptoren (MC<sub>3</sub> und MC<sub>4</sub>) antagonistisch zu  $\alpha$ -MSH (1.9.1.5.), was



durch eine kompetitive Verdrängung am Rezeptor zustande kommt (Fong et al. 1997, Ollmann et al. 1997). Zusätzlich hemmt es die basale Aktivität des MC<sub>4</sub>-Rezeptors (inverser Agonist) (Haskell-Luevano and Monck 2001). Somit bewirkt AgRP eine Feineinstellung des  $\alpha$ -MSH-Systems und gilt wie NPY als ein potenter Stimulator der Nahrungsaufnahme. Leptin beeinflusst AgRP auf die gleiche Weise wie es die NPY-Synthese beeinflusst (1.9.1.1.).

### ***1.9.1.3. Das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH)***

Das MCH gehört zu den orektisch wirkenden Peptiden und wird besonders in der LH synthetisiert. Es vermittelt seine Wirkung über MCH-Rezeptoren, die vor allem extrahypothalamisch aber auch hypothalamisch z.B. im ARC und VMH (1.10.1. und 1.10.2.) vertreten sind (Saito et al. 1999, Hervieu et al. 2000). Die Synthese von MCH sowie der MCH-Rezeptor-mRNA wird durch Hungern stimuliert und Leptin-induziert gehemmt (Qu et al. 1996, Sahu 1998, Kokkotou et al. 2001). Eine zentrale Injektion von MCH führte zur Steigerung der Futteraufnahme (Qu et al. 1996, Haynes et al. 1999a, Rossi et al. 1999), die jedoch geringer und kürzer war als die NPY-induzierte Nahrungsaufnahme (Edwards et al. 1999). So scheint der Einfluss von MCH auf metabolische Prozesse, die zu einer Gewichtszunahme führen, von größerer Bedeutung zu sein. Die Blockade von MCH während einer Kälteexposition bewirkte in Ratten bei nur geringer Einwirkung auf die Nahrungsaufnahme einen starken Gewichtsverlust bei gleichzeitiger Zunahme der BFG-Masse und der UCP-1-(entkoppelndes Protein, Thermogenin)-Expression (Pereira-da-Silva et al. 2003). Somit hemmt MCH über neuronale Konnektivitäten zu autonomen präganglionären Neuronen die sympathische Aktivität im BFG, was zu einer Abnahme der Thermogenese und der metabolischen Rate führt (Yoshida et al. 1983, Sakaguchi et al. 1988).

### ***1.9.1.4. Das Orexin bzw. Hypokretin***

Bei den Orexinen, auch unter dem Synonym Hypokretin bekannt, unterscheidet man die zu 46% identischen Subtypen A und B. Wie der Name bereits andeutet, sind sie orektisch wirksam und werden ebenso wie MCH durch Hungerzustände stimuliert (Cai et al. 1999, Mondal et al. 1999). Da Orexin-synthetisierende Neurone, die vor allem in der LH lokalisiert sind, Leptin-Rezeptoren exprimieren (Hakansson et al. 1999, Horvath et al. 1999) ist es nicht verwunderlich, dass Leptin einen direkt hemmenden Einfluss auf die Orexin A-Synthese hat (Beck and Richy 1999, Yamanaka et al. 2003). Im Gegensatz zur Leptin-induzierten kompletten Inhibition der NPY-Expression wird die Synthese von Orexin nur partiell inhibiert

(Zhu et al. 2002). Zentrale Injektionen von Orexin zeigten, dass Orexin A in Bezug zur Stimulation der Futteraufnahme effektiver ist als Orexin B (Sakurai et al. 1998). Zusätzlich erhöhen beide, unabhängig von der Nahrungsaufnahme, die metabolische Rate durch eine Erhöhung der sympathischen Aktivität (Lubkin and Stricker-Krongrad 1998, Shirasaka et al. 1999). Mittels viralem Tracing vom BFG konnte bestätigt werden, dass sowohl MCH- als auch Orexin-erge Neurone in der LH retrograd über die sympathischen Nervenbahnen viral infiziert und damit efferent zur sympathischen Innervation des BFG verbunden waren (Oldfield et al. 2002). Neben der Erhöhung der sympathischen Aktivität stimuliert Orexin über Projektionen zum *Cortex cerebri* die lokomotorische Aktivität sowie die Vigilanz, die oft während des Hungerns zu beobachten ist (Hagan et al. 1999, Ida et al. 1999). MCH- und Orexin-synthetisierende Neurone reagieren auf Leptin wahrscheinlich auch mit einer STAT3-Translokation (Hakansson et al. 1999), was über eine Synthese von SOCS-3 eine hemmende Wirkung auf die MCH- bzw. Orexin-Synthese vermittelt.

#### ***1.9.1.5. Das Proopiomelanocortin (POMC)***

Ein ebenfalls von den Neuronen des ARC gebildetes Neuropeptid ist das POMC, welches zusätzlich im Hypophysen-Vorderlappen synthetisiert wird. POMC wird posttranslational zu weiteren Peptiden, wie z.B. zum adrenocorticotropen Hormon (ACTH) oder  $\beta$ -Lipoprotein, mit unterschiedlichen biologischen Funktionen gespalten (1.9.3.2.). Im ARC entsteht aus ACTH  $\alpha$ -MSH und aus  $\beta$ -Lipoprotein  $\beta$ -Endorphin (Leibowitz and Wortley 2004). Die Wirkung von  $\alpha$ -MSH wird durch die Bindung an MC<sub>3</sub>- und MC<sub>4</sub>-Rezeptoren vermittelt (Fan et al. 1997, Schiöth et al. 1997), welche vor allem im Gehirn lokalisiert sind (Mountjoy et al. 1994). Es wirkt im Gegensatz zu NPY und AgRP anorektisch, erhöht die metabolische Rate sowie die sympathische Aktivität (Chen et al. 2000, Dunbar and Lu 2000). Eine zentrale Applikation von  $\alpha$ -MSH bewirkte eine potente Hemmung der Nahrungsaufnahme und verminderte die Adipositas-Anfälligkeit von genetisch fettleibigen Mäusen (Yaswen et al. 1999, Williams et al. 2001, Pierroz et al. 2002). Das  $\alpha$ -MSH-System kann somit als antagonistischer Gegenspieler zum NPY-System verstanden werden. Leptin wirkt auf POMC-Neurone, im Gegensatz zu NPY-, AgRP-, MCH- und Orexin-synthetisierende Neurone, stimulierend. Die Leptin-induzierte Synthese von POMC wird durch die Aktivierung von STAT3-Faktoren vermittelt, da der proximale POMC-Promotor ein STAT3-responsives Element besitzt (Bousquet et al. 2000) und POMC-erge Neurone nach peripherer Leptin-Applikation STAT3 exprimieren können (Münzberg et al. 2003).

#### **1.9.1.6. Das Cocain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART)**

Ein Pendant zu  $\alpha$ -MSH ist das von Douglass und Kollegen (1995) entdeckte Cocain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART) (Douglass et al. 1995). Die Hauptexpression dieses Peptids findet im *Hypothalamus* vor allem im ARC, DMH, PaV, *Nucleus praemamillaris ventralis* (PMV), in der *Area retrochiasmatica* (RCH) sowie in der LH statt (1.10.1. und 1.10.3. bis 1.10.7.) und nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation des Energiehaushalts (Koylu et al. 1997, Hurd and Fagergren 2000) sowie der Kontrolle der Reproduktion ein. Eine zentrale Verabreichung von CART führt zu einer Verminderung der Futteraufnahme (Kristensen et al. 1998, Lambert et al. 1998) und zu einer Stimulation von UCP-1, -2 und -3 im braunen (verstärkte Thermogenese) und weißen Fettgewebe sowie in der Muskulatur (Wang et al. 2000, Kong et al. 2003). In hypothalamischen Explantaten von präpubertären männlichen Ratten konnte CART in Verbindung mit Leptin die Interpuls-Intervalle der GnRH-Ausschüttung verringern und die GnRH-Amplitude in normalen zyklisierenden weiblichen Ratten erhöhen (Lebrethon et al. 2000, Parent et al. 2000). CART wird durch Leptin stimuliert (Kristensen et al. 1998) und ist während Hungerzuständen vermindert (Ahima et al. 1999, Robson et al. 2002). CART stellt somit ein Verbindungselement zwischen Leptin und der Regulation der Energie-Homöostase sowie der Reproduktion dar.

#### **1.9.1.7. Das Galanin-ähnliche Peptid (GALP)**

Das Neuropeptid GALP, welches erst 1999 aus dem *Hypothalamus* von Schweinen isoliert wurde (Ohtaki et al. 1999), wird ausschließlich in Neuronen des lateralen ARC gebildet (Larm and Gundlach 2000). Die Wirkung von GALP über 24 Stunden nach zentraler Applikation wird hauptsächlich durch den Galanin-2-Rezeptor vermittelt. Es kommt vor allem zur Hemmung der Nahrungsaufnahme, Reduktion des Körpergewichts (Larm and Gundlach 2000, Lawrence et al. 2003) und einer Erhöhung der Körperkerntemperatur über eine Aktivierung der sympathischen Efferenzen zum BFG (Lawrence et al. 2002a, Hansen et al. 2003). Durch Hungerzustände, die eine niedrige Leptin-Konzentration bedingen, wird die Aufnahme von zirkulierendem GALP ins Gehirn deutlich verringert (Kastin et al. 2001) und im Gegensatz dazu kann die mRNA-Synthese sowie Sekretion von GALP durch Leptin stimuliert werden (Krasnow et al. 2003, Seth et al. 2004). Die Wirkung von Leptin auf das GALP-System ist direkt vermittelt, da GALP-synthetisierende Neurone Leptin-Rezeptoren tragen (Gundlach 2002).

#### ***1.9.1.8. Der „brain derived neurotrophic factor“ (BDNF)***

Der neurotrophische Faktor des Gehirns (BDNF) ist ein Mitglied der Neurotrophin-Familie und ist für das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Neuronen wichtig. Dieses Neuropeptid wird vor allem im VMH (1.10.2.), in geringerem Maße auch in der LH und im PaV synthetisiert (Kernie et al. 2000). Es scheint eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiehaushaltes zu spielen. So wird die Synthese von BDNF durch Hungern reduziert (Xu et al. 2003) und sowohl zentrale als auch periphere Applikationen konnten zeigen, dass BDNF einen Gewichtsverlust durch eine verminderte Nahrungsaufnahme und erhöhten Energieverbrauch bewirkte (Pelleymounter et al. 1995a, Nakagawa et al. 2002). Die Expression von BDNF wird möglicherweise durch den Einfluss von Melanocortinen ( $\alpha$ -MSH) reguliert, da MC<sub>4</sub>-Agonisten die BDNF-mRNA im VMH signifikant erhöhten (Xu et al. 2003).

#### ***1.9.2. Regulation auf Ebene des autonomen Nervensystems***

Ein wichtiger Mechanismus für die Regulation des Energieverbrauchs stellt die zitterfreie Thermogenese durch das BFG und somit dessen erhöhte metabolische Rate dar. Sie wird durch die sympathische Innervation über  $\beta_3$ -Rezeptoren reguliert. Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren durch Noradrenalin kommt es in den braunen Fettzellen zu einer gesteigerten Lipolyse und Thermogenin-Bildung (UCP-1). UCP-1 entkoppelt die Atmungskette durch Hemmung der ATP-(Adenosin-Triphosphat)-Bildung. Auf diese Weise kann die aus der Lipolyse entstandene Energie vollständig in Wärme übergehen (Nedergaard et al. 2001). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass Leptin die Noradrenalin-Fluktuation zum BFG sowie die Aktivität der sympathischen Nerven (SNA) zum BFG, den Nieren, den Nebennieren und den Blutgefäßen an den Hinterbeinen fördert. Dieser Effekt trifft jedoch nicht für Gen-defekte fa/fa-Ratten zu, was beweist, dass der Sympathikus-aktivierende Effekt durch Leptin-Rezeptoren vermittelt sein muss (Mark et al. 2003). Die Erregung der sympathischen Neurone geschieht einerseits auf peripherer Ebene über sensorische Rezeptoren im Fettgewebe und andererseits auf zentraler Ebene in Segmenten des Rückenmarks. Dort löst Leptin als ein peripherer Stimulus neben der Aktivierung von hypothalamischen Kerngebieten wie z.B. dem ARC (Haynes 2000) eine sympatho-exzitatorische Reaktion aus (Tanida et al. 2000). Im Gegensatz zum BFG wird die Aktivität in renalen sympathischen Nerven durch die Reizung von arteriellen Baro-Rezeptoren moduliert, das heißt die Hauptfunktion der sympathischen Aktivierung ist hier die Blutdruckregulation

(Hausberg et al. 2002). Im BFG hingegen führt die Aktivierung der sympathischen Nerven zur Thermogenese und Erhöhung der metabolischen Rate (Mark et al. 2003). Ein weiterer Unterschied liegt darin, dass die SNA in den Nieren durch eine Blockade der MC<sub>4</sub>-Rezeptoren (Haynes et al. 1999b) und im BFG durch die Antagonisierung von CRH (Corticotropin-Releasing-Hormon) inhibiert werden kann (Correia et al. 2001). Die Erregung des Sympathikus bewirkt zusätzlich eine Reduktion der Leptin-Synthese und -Sekretion im WFG, die durch die Aktivierung der  $\beta$ -Rezeptoren vermittelt wird (1.3. und Abb. 9). Auf diese Weise reguliert Leptin seine Synthese und Freisetzung durch eine negative Rückkopplung selbst.

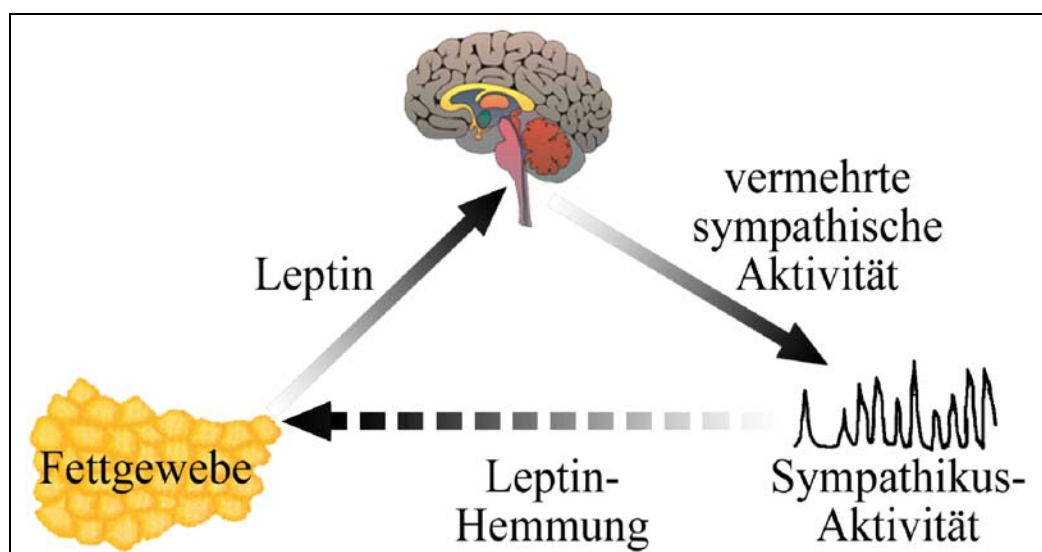


Abb. 9

Schematische Darstellung der negativen Rückkopplung über die Interaktion mit dem Sympathikus. Leptin stimuliert über das zentrale Nervensystem die Aktivität des Sympathikus. Ein gesteigerter Sympathikotonus hemmt daraufhin die Leptin-Synthese und -Sekretion im weißen Fettgewebe über  $\beta$ -Rezeptoren (1.3.). Modifizierte Abbildung nach Mark et al. (2003).

### 1.9.3. Regulation auf Ebene des Neuroendokriniums (Hypophyse)

Der Zustand des Hungerns geht mit einigen Anormalitäten wie z.B. Hypothermie bzw. verminderte Thermogenese, Hyperphagie, Immunsuppression und Infertilität einher (Friedman and Halaas 1998). Diese zum Teil durch hormonelle Inbalancen auftretenden Phänomene sind auch bei einer ob- und db-Mutation zu beobachten und können durch eine Leptin-Substitution aufgehoben werden. Leptin kann somit neben der Regulation der physiologischen Reaktion auf Hungerzustände (Ahima et al. 1996) ebenso als ein Mediator von Hormonsystemen verstanden werden. In diesem Kapitel soll die regulatorische Wirkung von Leptin auf die verschiedenen hypophysären Hormonsysteme näher beleuchtet werden.

### **1.9.3.1. Regulation der Gonadotropine**

Die hormonelle Stimulation der ovariellen bzw. testikulären Funktion hat seinen Ursprung im *Hypothalamus*. Durch die Synthese von GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon) im *Nucleus preopticus medianus* (MnPO) und *medialis* (MPO) sowie im OVLT wird die Synthese und Freisetzung von Gonadotropinen, wie LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) stimuliert, die im HVL (Hypophysen-Vorderlappen) synthetisiert und gespeichert werden. LH und FSH gelangen anschließend über den Blutweg zu den Gonaden, fördern die Synthese von Sexualhormonen und bewirken in weiblichen Individuen die Follikelreifung sowie die Ovulation und im männlichen Organismus die Spermatogenese (Schmidt et al. 2004). Diese postpubertäre physiologische Funktion ist bei Leptin-defizienten oder -insensitiven Individuen gehemmt und führt zur verspäteten Pubertät und Infertilität. Eine Substitution von Leptin hebt diese Anomalitäten wieder auf (Chehab et al. 1996, Ewart-Toland et al. 1999). Leptin stimuliert die Sekretion von GnRH aus dem *Hypothalamus* direkt über Leptin-Rezeptor-exprimierende GnRH-Neurone ebenso wie die Synthese und Freisetzung von LH und FSH im HVL (Yu et al. 1997b, Yu et al. 1997a, Zamorano et al. 1997). Während der mittleren bis späten Follikelphase passt sich die hochfrequente, pulsatile LH-Ausschüttung mit niedriger Amplitude den niederfrequenten und hochausschlagenden Pulsen der Leptin-Sekretion während des Nachtzyklus (Mensch) an (Licinio et al. 1998). Carro und Kollegen (1997) konnten durch eine i.c.v.-Injektion von Leptin-Antiserum eine LH-Synthese verhindern (Carro et al. 1997b). Studien an hypothalamischen Explantaten aus der RCH von präpubertären männlichen Ratten zeigten, dass Leptin einen stimulierenden Effekt auf die Pulsfrequenz jedoch nicht auf die Amplitudenhöhe der GnRH-Ausschüttung hat (Lebrethon et al. 2000) und eine Insulin-induzierte GnRH-Ausschüttung potenziert (Burcelin et al. 2003).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Leptin die GnRH-Ausschüttung aus dem Gehirn möglicherweise auch über indirekte hypothalamische Signalwege stimuliert (Abb. 11).

### **1.9.3.2. Regulation der Glucocorticoide**

Die Corticosteron-Ausschüttung aus der Nebennierenrinde wird über die CRH-Synthese im *Hypothalamus* angeregt, welche im HVL eine ACTH-Freisetzung stimuliert. Neben der Freisetzung von ACTH aus dem HVL werden gleichzeitig  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -Endorphin freigesetzt. ACTH ist ebenso wie  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -Endorphin ein Spaltprodukt des POMC, daher werden diese Peptide gemeinsam synthetisiert und ins Blut abgegeben (1.9.1.5.). Durch

die Wirkung von CRH auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse bewirkt das vermehrt im Blut zirkulierende ACTH in der Nebennierenrinde in erster Linie eine Glucocorticoid-Synthese sowie dessen Sekretion. Die Glucocorticoide koppeln negativ zum *Hypothalamus* und zur *Hypophyse* zurück. Sie fördern die metabolische Rate, indem sie die Glukoneogenese stimulieren, auf den Eiweiß-Stoffwechsel katabol wirken und den Fettsäure-Spiegel im Blut durch Verminderung der Glukose-Aufnahme in die Zellen erhöhen, und hemmen Entzündungsgeschehen (Schmidt et al. 2004). Eine Hypercorticosteronämie charakterisiert ebenso wie Infertilität die hormonelle *Aberratio* bei Leptin-Defizienz bzw. -Insensitivität (Ahima et al. 1999), welche durch Leptingaben reguliert werden kann (Ahima et al. 1998). So hemmt Leptin die Glucocorticoid-Synthese sowie die ACTH-stimulierte Glucocorticoid-Sekretion in der Nebennierenrinde (Bornstein et al. 1997, Heiman et al. 1997, Pralong et al. 1998). Über den Effekt von Leptin auf die Synthese von CRH in hypothalamischen Neuronen hingegen gibt es kontroverse Meinungen. So konnte durch Leptin einerseits eine Hypoglykämie-induzierte CRH-Sekretion gehemmt (Heiman et al. 1997) und andererseits eine CRH-Freisetzung unter basalen Bedingungen (Costa et al. 1997) sowie eine CRH-mRNA-Expression bei gehungerten Ratten im PaV stimuliert werden (Schwartz et al. 1996a). Eine weitere Interaktion zwischen Leptin und Glucocorticoiden besteht in den pulsatil schwankenden Plasma-Spiegeln (45min-Intervall mit einem ca. 3min anhaltendem Peak). Ein hoher Glucocorticoid- sowie ACTH-Spiegel koinzidiert bei Mensch und Tier mit einer niedrigen Leptin-Konzentration und umgekehrt (Licinio et al. 1997).

Neben dem Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse aktiviert CRH auch das autonome Nervensystem über hypothalamische und extrahypothalamische Neurone und wirkt dadurch regulierend auf den Energiehaushalt. Durch physiologische Studien konnte gezeigt werden, dass die Synthese von CRH während einer positiven Energiebilanz stimuliert und während einer negativen inhibiert wird (Seeley et al. 1996, Fekete et al. 2000a). Nach zentraler Applikation reduziert CRH die Futteraufnahme (Spina et al. 1996, Jeanrenaud and Rohner-Jeanrenaud 2000), aktiviert sympathische Efferenzen zum BFG und lässt den Sauerstoffverbrauch ansteigen (LeFeuvre et al. 1987, Arase et al. 1988, Egawa et al. 1990, Richard et al. 2000), wodurch die Thermogenese stimuliert und das Körpergewicht reduziert wird. In einigen Studien wurde auch gezeigt, dass zum einen die Gabe von CRH-Antagonisten den Leptin-induzierten anorektischen Effekt verminderte und zum anderen eine zentrale Leptin-Applikation einen stimulierenden Effekt auf die CRH-Synthese hatte (Uehara et al. 1998, Nishiyama et al. 1999, Richard et al. 2000).

Ein zur Familie des CRH gehörendes Peptid ist Urocortin, dessen Wirkung auf den Energie-Haushalt und die Nahrungsaufnahme der des CRH entspricht, jedoch länger anhält (Spina et al. 1996, Currie et al. 2001, Wang et al. 2001). Leptin erleichtert die Aufnahme von Urocortin ins Gehirn (Kastin et al. 2002).

#### ***1.9.3.3. Regulation der Schilddrüsenhormone***

Hypothalamische Neurone synthetisieren das TRH (Thyreotropin-Releasing-Hormon), welches im HVL die Sekretion von TSH bewirkt. TSH gelangt schließlich über den Blutweg zur *Thyreoidea* und stimuliert die Synthese und Freisetzung von Trijodthyronin (T<sub>3</sub>) und Thyroxin (T<sub>4</sub>). Im Körper steigern diese den Energieumsatz, indem sie die Proteinbiosynthese in allen Körperzellen stimulieren, fördern die Utilisation von Kohlenhydraten durch vermehrte Enzymaktivität sowie das Wachstum bei Juvenilen. Eine negative Rückkopplung auf den *Hypothalamus* und die *Hypophyse* hemmt die TRH- und TSH-Synthese und -Freisetzung. Hohe zirkulierende Konzentrationen an Schilddrüsenhormonen bewirken eine niedrige TSH-Konzentration, niedrige T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Konzentrationen induzieren dagegen einen hohen TSH-Spiegel im Blut (Schmidt et al. 2004). Dieser Regelkreis wird durch Hungerzustände und Krankheiten unterbrochen, die mit einer verminderten TRH- und TSH-Sekretion einhergehen (Blake et al. 1991, Rondeel et al. 1992). Solche Krankheiten werden als „euthyroid sick syndrome“ bezeichnet und sind charakterisiert durch eine Insensitivität der TRH-synthetisierenden Neurone gegenüber der schließlich erniedrigten T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Konzentration. Diese Tatsache ist ausschlaggebend für einen verminderten Energieverbrauch durch herabgesetzte Schilddrüsenhormon-abhängige Thermogenese und gesenkten Proteinkatabolismus während Hungerzuständen und Krankheiten (Ahima et al. 2000). Ein verminderter Leptin-Spiegel (Hunger) verhindert die Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen durch eine Hemmung der TRH-mRNA-Expression im PaV (Ahima et al. 1996, Legradi et al. 1997, Seoane et al. 2000). Die Regulation der TRH-Synthese im PaV durch Leptin erfolgt einerseits indirekt über den ARC, dessen Neurone zum PaV hin projizieren (1.10.1.) (Legradi and Lechan 1998, Fekete et al. 2000b) und andererseits direkt über den langen Leptin-Rezeptor an TRH-ergen Neuronen im PaV (1.10.4.) (Ahima et al. 2000, Huo et al. 2004). Diese Leptin-induzierte Biosynthese von TRH in Neuronen des PaV scheint direkt durch eine STAT3-Aktivierung vermittelt zu sein, da TRH-erge Neurone STAT3 exprimieren können (Huo et al. 2004). So konnte in einer Ob-Rb-exprimierenden Zelllinie eine Leptin-induzierte STAT3-Aktivierung tatsächlich den TRH-Promotor über eine autorisierte STAT-Bindungsstelle aktivieren (Harris et al. 2001).



#### **1.9.3.4. Regulation des Wachstumshormons**

Die Sekretion von GH (Wachstumshormon) aus dem HVL wird zum einen durch die Synthese seines hypothalamischen Releasing-Hormons (GHRH) und zum anderen durch eine verminderte Somatostatin-Synthese im *Hypothalamus* stimuliert. Ebenso wirken verschiedene Bedingungen wie Hunger-Hypoglykämie, Stress und körperliche Aktivität fördernd auf die GH-Synthese und -Sekretion. GH wirkt stimulierend auf den Metabolismus. Es fördert direkt die Chondrogenese, das Knochenwachstum, die Lipolyse und Glykogenolyse (Insulin-antagonistisch) sowie indirekt über eine IGF-Stimulation („Insulin-like-growth-factor“), vor allem über IGF-1, ebenfalls die Chondrogenese sowie das Knochenwachstum und zusätzlich die Proteinsynthese (Insulin-agonistisch) sowie die Zellteilung. IGF koppelt wiederum negativ auf den *Hypothalamus* und damit auf die GHRH-Synthese zurück (Schmidt et al. 2004). Die Interaktion von Leptin auf den GH-Regelkreis wird kontrovers diskutiert. Zum einen bewirken Hungerzustände im Nager einen GH-Anstieg der durch Leptin-Substitution aufgehoben werden kann (Carro et al. 1997a, Vuagnat et al. 1998), zum anderen sind aber die IGF-1-Werte gesenkt. Eine Leptin-Defizienz oder -Insensitivität hemmt die GH-Synthese und -Sekretion (Tannenbaum et al. 1990) ebenso wie eine Gabe von Leptin-Antiserum bei gesunden Individuen (Carro et al. 1997a). Auch konnte eine zentrale Applikation von Leptin eine Erhöhung der mRNA-Expression von GH und GHRH bei gleichzeitiger Hemmung der Somatostatin-mRNA-Expression bewirken (Cocchi et al. 1999). Die stimulierende Wirkung von Leptin auf die GH-Synthese und -Sekretion kommt erstens durch den hemmenden Effekt auf die Somatostatin- und die Induktion der GHRH-Synthese im *Hypothalamus* (Carro et al. 1999) und zweitens durch eine direkte stimulierende Wirkung auf die Hypophyse zustande (Yu et al. 1997b). Immunhistochemische Studien konnten zeigen, dass Leptin-responsive Zellen im *Hypothalamus* der Ratte, die mit einer Leptin-induzierten STAT3-Translokation reagierten, ebenso Somatostatin-Rezeptoren exprimierten. Solche Neurone sind vor allem im ARC, VMH, DMH, PaV und der LH lokalisiert (Stepanyan et al. 2003).

#### **1.9.3.5. Regulation des Prolaktins**

Der Freisetzungsmechanismus von Prolaktin ist sehr komplex. Die Synthese und Sekretion wird hauptsächlich durch einen inhibitorischen Transmitter, das Dopamin, reguliert. Es wird in Neuronen des *Hypothalamus* (dorsaler Anteil des ARC und Pe) fortlaufend gebildet (Freeman et al. 2000). Vor allem das Abschalten der Dopamin-Sekretion in diesen Kerngebieten aber auch die Wirkung von TRH, VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid),

Angiotensin-II,  $\beta$ -Endorphin und ein hoher Östrogen-Spiegel lassen die Prolaktin-Synthese im HVL ansteigen. Prolaktin koppelt selbst negativ auf den *Hypothalamus* zurück, indem es dort den Dopaminumsatz verstärkt und dadurch seine eigene Synthese und Sekretion hemmt (Lerant et al. 2001). Es fördert in der Milchdrüse die Galaktogenese und -poese (Schmidt et al. 2004). Hinuma und Kollegen (1998) entdeckten ein neues Peptid, das sogenannte „prolactin-releasing-peptide“ (PrRP), welches analog zu anderen hypophysiotropen Faktoren (1.9.3.1. bis 1.9.3.4.) in der Lage ist, spezifisch auf die Sekretion der im HVL gespeicherten Hormone (für PrRP ist dies Prolaktin) stimulierend einzuwirken (Hinuma et al. 1998). Immunhistochemische Analysen ergaben eine Lokalisation von PrRP-Neuronen vor allem im DMH (1.10.3.) aber auch im *Nucleus tractus solitarius* (Sol), der im Hirnstamm lokalisiert ist (Maruyama et al. 1999). PrRP-Rezeptoren kommen vor allem im HVL, was auf eine Prolaktin-sekretorische Wirkung schließen lässt, und im *Hypothalamus* vor (Maruyama et al. 1999, Roland et al. 1999). Über die modulierende Wirkung von Leptin auf Prolaktin gibt es nur wenige Veröffentlichungen. Es gibt Hinweise darauf, dass die stimulierende Wirkung von Leptin auf die Prolaktin-Synthese und -Sekretion über die Aktivierung von MC<sub>3</sub>- und MC<sub>4</sub>-Rezeptoren vermittelt ist, da die Stimulation durch MC<sub>3</sub>- und MC<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden kann (Watanobe et al. 1999b, Watanobe et al. 1999a). Neben der Prolaktin-sekretorischen Wirkung konnte zentral appliziertes PrRP die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht senken (Lawrence et al. 2000, Lawrence et al. 2002b) sowie eine Hyperthermie und ein Ansteigen der UCP-1-mRNA sowie des Sauerstoffverbrauchs herbeiführen (Ellacott et al. 2003, Lawrence et al. 2004). Weiterhin war die PrRP-mRNA in Situationen negativer Energiebilanzen (Hungerzustände) und bei chronischer, genetisch bedingter Adipositas vermindert (Lawrence et al. 2000, Ellacott et al. 2002, Lawrence et al. 2002b). Da PrRP-erge Neurone Leptin-Rezeptoren exprimieren, vermitteln sie, neben anderen Systemen, Nahrungsaufnahme- und Körpergewicht-reduzierende Effekte von Leptin (Ellacott et al. 2002).

### **1.10. Zielstrukturen für Leptin im *Hypothalamus* der Ratte**

Die Zielgewebe von Leptin im Organismus befinden sich jeweils dort, wo auch die Rezeptoren (Ob-R, 1.6.1.) lokalisiert sind. Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit soll auf den *Hypothalamus* als Zielstruktur gerichtet werden. Die Verteilung der Leptin-Rezeptoren im Gehirn ist sehr vielschichtig. Durch *in situ* Hybridisierung konnten die unterschiedlichen Subtypen im Gehirn genau lokalisiert werden. So kommen alle Formen (lange und kurze

Rezeptoren) in starker Ausprägung in den hypothalamischen Kerngebieten ARC, DMH, VMH, RCH, Pe und PMV sowie in schwacher Ausprägung in der LH und dem PaV (parvozellulärer Subkern) vor. Keine Rezeptoren wurden im PaV (magnozellulärer Subkern) und dem SO gefunden. Außer im *Hypothalamus* wurden speziell die kurzen Subtypen des Leptin-Rezeptors zusätzlich im PC, den Meningen und in kleinen Blutgefäßen im gesamten Gehirn nachgewiesen, wobei aber der Zelltyp nicht identifiziert wurde. Der lange Rezeptor konnte mittels *in situ* Hybridisierung jedoch nur sehr vereinzelt in diesen Strukturen nachgewiesen werden. Außerdem konnten Rezeptoren im *Thalamus*, *Hippocampus*, *Cortex piriformis* (Pir), *Nucleus geniculatus*, Kern des *Tractus olfactorius*, *Substantia nigra*, *Nucleus raphe dorsalis*, Sol und im *Cerebellum* gefunden werden (Elmqvist et al. 1998a). Durch radioaktiv markiertes Leptin ( $^{125}\text{I}$ -Leptin) wurden Leptin-Bindungsstellen pH-abhängig im PC autoradiografisch nachgewiesen (Corp et al. 1998). Mittels immunhistochemischer Analyse konnte im *Hypothalamus* neben dem ARC, VMH, DMH auch im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCh), dem SO, dem PaV (magnozellulärer Subkern), dem *Nucleus tuberomamillaris* (TM) sowie in der *Area praeoptica* (POA), dem OVLT, dem SFO sowie in ependymalen Zellen des  $\text{V}_{\text{III}}$  und im Hirnstamm in der AP sowie im *Nucleus vagus dorsomotorius* (MNV) die lange Form der Leptin-Rezeptoren gefunden werden (Hakansson et al. 1998, Baskin et al. 1999c, Meister and Hakansson 2001). Da nach heutigem Wissensstand nur der lange Subtyp Ob-Rb aufgrund seiner langen intrazellulären Domäne in der Lage ist, die JAK-STAT-Kaskade zu aktivieren, kommt es in der vorliegenden Arbeit vor allem auf dessen Präsenz an (1.6.2.1.). Neben peripheren Geweben kommt dieser funktionelle Subtyp vor allem im *Hypothalamus* vor (Sweeney 2002, Hegyi et al. 2004). Somit können über eine Detektion von STAT-Faktoren funktionelle Zielstrukturen im *Hypothalamus* nachgewiesen werden.

#### **1.10.1. Der Nucleus arcuatus (ARC)**

Als eine wichtige Zielstruktur des Fettgewebeshormons Leptin ist der ARC zu nennen. Seine Neurone exprimieren besonders stark den langen und funktionellen Rezeptor-Subtyp Ob-Rb und reagieren sehr gut auf intracerebroventrikulär appliziertes Leptin mit einer nukleären STAT3-Translokation (Tab. 21). Der ARC ist an der Basis des *Hypothalamus* lateral des  $\text{V}_{\text{III}}$  lokalisiert und erstreckt sich vom caudalen Ende des *Chiasma opticum* (ca. Bregma –2mm) bis hin zum *Corpus mamillare* (ca. Bregma –4,5mm) (Abb. 15). In ihm lassen sich drei Subkerne differenzieren, die sich in ihrer topographischen Lage unterscheiden. So existiert ein dorsaler, ein medialer und ein lateraler Anteil (Paxinos and Watson 1998) (Abb. 4). Der mediale und laterale Anteil spielen aufgrund der Produktion vieler Neuropeptide, die an der

Regulation der Futteraufnahme beteiligt sind, eine Schlüsselrolle für die Aufrechterhaltung der Energie-Homöostase (Kalra et al. 1999). Hierzu zählen das NPY, das AgRP, das POMC mit seinem Spaltprodukt dem  $\alpha$ -MSH, das CART und das Galanin-ähnliche Peptid (GALP) (1.9.1.). Der größte Anteil der NPY-, AgRP-, POMC-, CART- und GALP-synthetisierenden Neurone koexprimieren die lange Form der Leptin-Rezeptoren (Cheung et al. 1997, Baskin et al. 1999a, Baskin et al. 1999c).

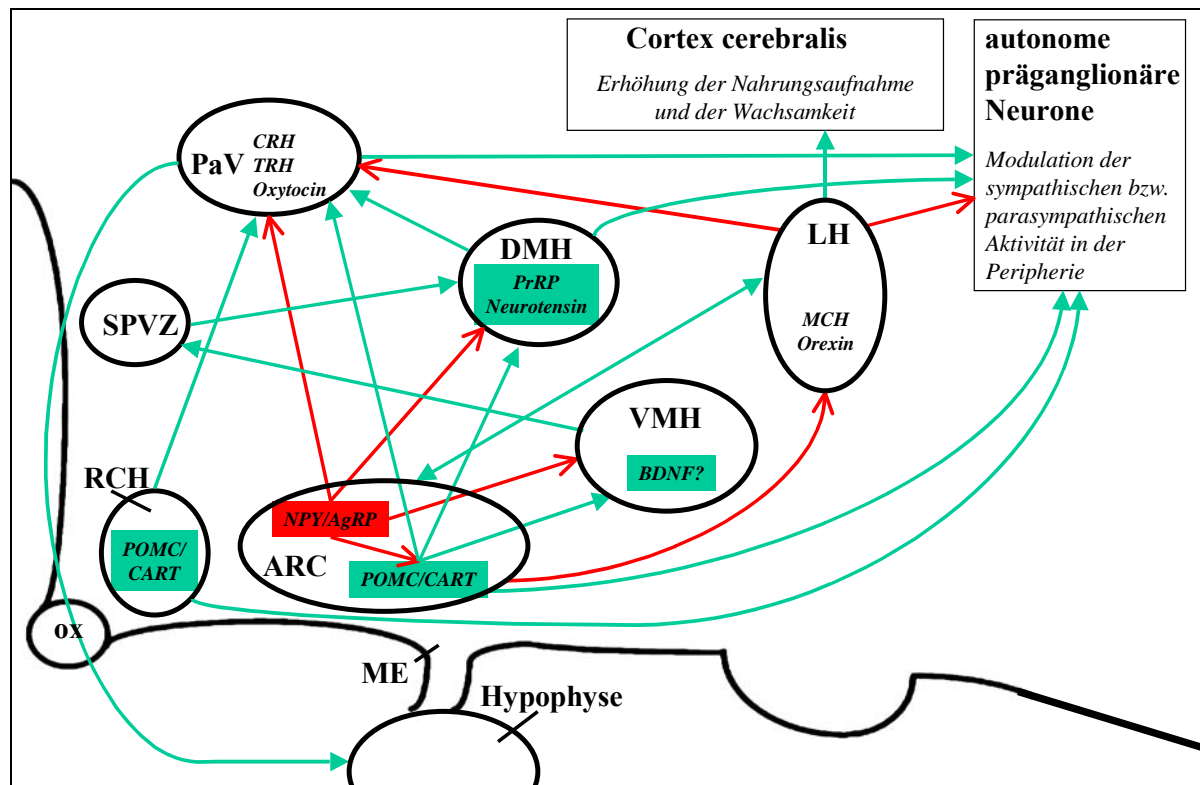


Abb. 10

Schematische Darstellung der gegenseitigen Beeinflussung und Wirkung von orexigenen und anorexigenen Neuropeptiden sowie ihrer Leptin-abhängigen Modulation im *Hypothalamus*. Rot unterlegte Flächen deuten einen hemmenden Einfluss und grün unterlegte Flächen einen stimulierenden Einfluss von Leptin an. Rote offene Pfeile deuten eine Neuropeptid- bzw. -transmitter-vermittelte Inhibition und grüne geschlossene Pfeile eine Stimulation an. Erläuterungen im Text von 1.10.1. bis 1.10.7.

Neurone des medialen Anteils des ARC synthetisieren neben NPY als einzige neuronale Population AgRP und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) (Shutter et al. 1997, Broberger et al. 1998b, Hahn et al. 1998) und interagieren über Konnektivitäten zu anderen hypothalamischen Kerngebieten mit zahlreichen weiteren, den Energiehaushalt regulierenden Peptiden (Abb. 10). So hemmen sie beispielsweise CRH und TRH im PaV, POMC/CART im ARC sowie Serotonin (5-HT) im Mittelhirn, stimulieren Orexin und MCH in der LH und interagieren mit dem VMH (Sawchenko 1998, Elmquist et al. 1999, Kalra et al. 1999, Williams et al. 2000, Kalra and Kalra 2003). Interessanterweise hemmen NPY-erge Neurone im medialen ARC die

elektrische Aktivität der POMC/CART-ergen Neurone im lateralen ARC sowie der TRH-ergen Neurone im PaV über die Wirkung von GABA, die mit NPY und AgRP kosynthetisiert wird (Cowley et al. 2001, Fekete et al. 2001, Fekete et al. 2002a). Somit führt eine Leptin-induzierte Hemmung von NPY auch zu einer verminderten GABA-Ausschüttung und damit zu einer Enthemmung der POMC/CART-Neurone (Cowley et al. 2001). AgRP inhibiert ebenfalls TRH-erge Neurone, im PaV jedoch über die antagonistische Wirkung am MC<sub>4</sub>-Rezeptor (Fekete et al. 2002b). Im Gegensatz zu Egawa und Kollegen (1991) und Billington und Kollegen (1994), die eine NPY-induzierte verminderte Aktivität der sympathischen Efferenzen zum BFG messen konnten (1.9.1.1.), konnte in neuroanatomischen Studien, in welchen das braune Fettgewebe viral infiziert wurde, durch retrogrades Tracing und immunhistochemische Verfahren gezeigt werden, dass NPY-markierte Neurone im ARC nicht über die sympathischen Efferenzen zum BFG retrograd infiziert waren (Oldfield et al. 2002). Daher stellten Oldfield und Kollegen (2002) die Hypothese auf, dass entweder NPY-erge Neurone an diesen Stellen keine synaptischen Kontakte zu den viral-infizierten Zellen ausbilden oder dass das Neuropeptid-Y, welches die oben genannten Effekte bewirkt, nicht aus dem ARC stammt (Oldfield et al. 2002).

In lateral gelegenen Neuronen des ARC werden POMC mit seinem Spaltprodukt  $\alpha$ -MSH und CART in einer separaten aber parallelen Population zu den NPY/AgRP-Neuronen kosynthetisiert (Watson and Akil 1979, Elias et al. 1998a). Diese Neurone exprimieren ebenso die lange und funktionelle Form der Leptin-Rezeptoren Ob-Rb (Elias et al. 2001). Die Expression von POMC und CART wird durch Leptin stimuliert (Kristensen et al. 1998) und ist während Hungerzuständen vermindert (Ahima et al. 1999, Robson et al. 2002). POMC- und CART-produzierende Neurone des ARC projizieren zum PaV (Abb. 10), wo sie über eine  $\alpha$ -MSH-induzierte Stimulation von CRH und TRH zu einer Aktivierung der sympathischen Efferenzen zum BFG und damit zur Steigerung der Thermogenese führen (Kiss et al. 1984). Andererseits können jedoch manche Neurone auch mit der LH verschaltet sein (Abb. 10), wo sie mit MCH- und Orexin-synthetisierenden Neuronen Kontakt aufnehmen (Broberger et al. 1998a, Elias et al. 1998b, Elias et al. 1999). Eine letzte Möglichkeit ist die direkte Projektion zu präganglionären sympathischen Neuronen im Rückenmark (Oldfield et al. 2002). Im Einklang mit dieser Möglichkeit konnte durch retrograde Tracing-Versuche bei viraler Infektion des BFG nachgewiesen werden, dass POMC- und CART-Neurone im ARC viral infiziert waren (Oldfield et al. 2002). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass CART-Neurone zu GnRH-synthetisierenden Neuronen im MnPO, MPO und OVLT sowie zum *Nucleus periventricularis anteriolaterale* (AVPe) projizieren und damit eine Verbindung zum

Reproduktionssystem herstellen (Abb. 11) (Rondini et al. 2004). Diese Hypothese muss aber noch durch weitere Untersuchungen untermauert werden. Manche POMC-ergen Neurone des ARC koexprimieren außer CART zusätzlich das Neuropeptid GALP (Takenoya et al. 2002) und stellen eine direkte Zielstruktur für Leptin dar. Sie projizieren vor allem zum PaV und zur LH (1.10.4. und 1.10.5.) (Takatsu et al. 2001).

### ***1.10.2. Der Nucleus hypothalamicus ventromedialis (VMH)***

Neben dem ARC kommen auch im VMH Ob-Rb-Rezeptoren in hoher Dichte vor, und seine Neurone antworten sehr gut mit einer nukleären STAT3-Translokation auf zentral appliziertes Leptin (Tab. 21). Er befindet sich beiderseits dorsolateral des ARC und erstreckt sich in etwa –2,1mm bis –3,7mm von Bregma. Er lässt sich in drei topografisch unterschiedliche Subkerne, den dorsomedialen, den zentralen und den ventrolateralen Subkern unterteilen (Paxinos and Watson 1998) (Abb. 4). Neben dem ARC, der eine wesentliche Rolle bei der Steuerung des Essverhaltens und der metabolischen Aktivität spielt, ist auch der VMH in die Regulation einer ausgeglichenen Energiebilanz involviert. Wenngleich es bis heute nur wenige Hinweise auf die Expression orektisch oder anorektisch wirkender Neuropeptide innerhalb des VMH gibt (BDNF, 1.9.1.8.), führten Mikroinjektionen von NPY (Currie and Coscina 1997), Galanin (Kyrkouli et al. 1990) und GABA in den VMH zu einer Steigerung der Futteraufnahme, während Injektionen von Leptin und Urocortin hemmend wirkten (Satoh et al. 1997, Ohata et al. 2000). Zudem führten Injektionen von Leptin in den VMH zu einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks und der Aktivität sympathischer Nerven zu den Nieren (Marsh et al. 2003) sowie zur Erhöhung der Glukoseaufnahme in der Herz-, Skelettmuskulatur und im BFG (Minokoshi et al. 1999). Läsionen des VMH verursachten einen rapiden Anstieg der Plasma-Leptinspiegel, was durch einen stimulierenden Effekt auf die Leptin-Synthese im weißen Fettgewebe einerseits durch den läsionierten VMH selbst und andererseits durch die bei der VMH-Läsionierung entstandenen Hyperinsulinämie zurückzuführen war (Suga et al. 1999a, Suga et al. 1999b). Ebenso erhöhte eine VMH-Läsionierung den Corticosteroid-Spiegel, löste Diabetes aus (Dallman 1984) und verursachte eine Verringerung des zentralen Sympathikotonus, was in einer verminderten Thermogenese im BFG, einer Hyperphagie sowie einer langanhaltenden unphysiologischen Gewichtszunahme resultierte (Storlien and Albert 1972). Im Gegensatz dazu führte eine elektrische Stimulation des VMH zu einer Steigerung der sympathischen Aktivität und der Thermogenese im BFG (Chen et al. 1998). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass der VMH eine Rolle als Empfänger und Vermittler unterschiedlicher Signalmoleküle der

Nahrungsaufnahme spielt. Neurone des VMH projizieren hauptsächlich zur subparaventriculären Zone (SPVZ, Abb. 10) (Elmqvist et al. 1998b), die wiederum kontaktile Fasern aus dem SCH erhält. Der SCH ist als zirkadianer Schrittmacher bekannt und spielt eine Schlüsselrolle in der zirkadianen Rhythmik, auch im Bezug auf die Nahrungsaufnahme (Watts and Swanson 1987, Canteras et al. 1994). Im folgenden projizieren Neurone der subparaventriculären Zone zum DMH und dessen Neurone zum PaV, von wo aus die Sekretion von Hypophysen-Hormonen stimuliert wird. So beeinflusst eine Hemmung des VMH, ebenso wie eine Futterrestriktion im Nachtzyklus, die tagesrhythmischen Corticosteron-Spiegel (Moberg et al. 1975, Krieger 1980). Dies bedingt die in 1.9.3.2. beschriebene inverse Beziehung der Plasma-Spiegel von Leptin und Corticosteroiden.

### ***1.10.3. Der Nucleus hypothalamicus dorsomedialis (DMH)***

Der DMH ist eine weitere stark Leptin-responsive Struktur im *Hypothalamus* der Ratte, in dem die lange Form der Leptin-Rezeptoren in einer hohen Dichte vertreten ist (Tab. 21). Er ist dorsal des VMH beiderseits lateral des V<sub>III</sub> aufzufinden und erstreckt sich in etwa –2,5mm bis –3,6mm von Bregma. Der DMH lässt sich in einen dorsalen, ventralen und einen sogenannten kompakten Subkern unterteilen, wobei sich der kompakte Anteil als der kleinste Subkern in etwa –3,1mm bis –3,3mm von Bregma erstreckt (Abb. 4). Der ventrale Subkern beginnt ca. in Höhe –3,3mm bis –3,6mm von Bregma und der dorsale erstreckt sich über den gesamten Bereich (Paxinos and Watson 1998). Läsionen des DMH führten zu einer Erhöhung der Aktivität von autonomen präganglionären Neuronen, die zum Pankreas projizieren, was eine vermehrte Insulin-Sekretion bedingte und Veränderungen des Verhaltens, der Nahrungsaufnahme sowie des Wachstums und der körperlichen Verfassung nach sich zog (Yoshimatsu et al. 1984, Bernardis and Bellinger 1987). Stimulationen hingegen bewirkten eine Hyperglykämie sowie ein Ansteigen der Plasma-Katecholamin-Konzentration (Frohman and Bernardis 1971) und stimulierten die Thermogenese im BFG (Zaretskaia et al. 2003). Die efferenten Projektionen des DMH zum BFG konnten durch virales Tracing vom BFG bestätigt werden, da retrograd infizierte Neurone vor allem im dorsalen Subkern des DMH nachgewiesen wurden (Cano et al. 2003, Yoshida et al. 2003). Mikroinjektionen von Leptin in den DMH führten zu erhöhtem arteriellen Blutdruck und gesteigerter Herzfrequenz (Marsh et al. 2003). Neurone des DMH synthetisieren unter anderem das Neuropeptid CART und projizieren hauptsächlich zu parvozellulären Neuronen des PaV (Abb. 10) (Ter Horst and Luiten 1986, Rondini et al. 2004) aber auch zum *Nucleus raphe pallidus* (Rpa) in der *Medulla*, der spezifisch die Aktivität der sympathischen Nerven zum BFG kontrolliert und

somit den Metabolismus der Adipozyten und die Thermogenese im BFG reguliert (Morrison 1999). Zusätzlich projizieren sie aber auch zu GnRH-synthetisierenden Neuronen und vermitteln die stimulierende Wirkung von Leptin auf die GnRH-Synthese (Abb. 11) (Rondini et al. 2004).

Immunhistochemische Analysen ergaben vor allem im DMH aber auch in dem im Hirnstamm lokalisierten Sol ein Vorkommen von PrRP-synthetisierenden Neuronen (1.9.3.5.). Im PaV nehmen die aus dem DMH projizierenden PrRP-Neurone sowohl mit magno- als auch mit parvozellulären Neuronen, die vor allem Oxytocin und wahrscheinlich auch Vasopressin exprimieren, Kontakt auf (Maruyama et al. 1999). Da PrRP-Neurone Leptin-Rezeptoren tragen, zeigt dies eindeutig, dass diese Neurone potente Zielzellen für Leptin darstellen (Ellacott et al. 2002). Neben CART und PrRP können Neurone des DMH auch Neurotensin synthetisieren, dessen Sekretion von PrRP Dosis-abhängig stimuliert wird (Ibata et al. 1984, Ibata et al. 1986) und projizieren ebenfalls zum PaV (Ter Horst and Luiten 1986). Neurotensin hemmt die Nahrungsaufnahme und ist als ein Mediator des zentralen anorektischen Effekts von Leptin bekannt (Hawkins 1986, Sahu et al. 2001).

#### **1.10.4. Der Nucleus paraventricularis (PaV)**

Eine weitere Zielstruktur von Leptin im *Hypothalamus* ist der PaV, welcher sich in etwa –0,8mm bis –2,5mm von Bregma beiderseits direkt lateral am Dach des V<sub>III</sub> erstreckt und in einen magnozellulären (großzellig) und einen parvozellulären (kleinzellig) Anteil unterteilt werden kann. Der magnozelluläre Subkern befindet sich im lateralen und der parvozelluläre hauptsächlich im medialen Anteil des PaV, wobei sich einige wenige parvozelluläre Neurone in einer dorsal aufliegenden Kappe befinden (Paxinos and Watson 1998). In der Ausrichtung von rostral nach caudal unterscheidet man einen *Partus anterioris* (ca. Bregma –0,8mm bis –1,8mm), einen *Partus medius* (ca. Bregma –1,8mm bis –2,1mm) und einen *Partus posterioris* (ca. Bregma –2,1mm bis –2,5mm). Dabei erstreckt sich der parvozelluläre Subkern über alle drei Anteile hinweg, wohingegen der magnozelluläre Subkern ausschließlich im *Partus medius* aufzufinden ist (Paxinos and Watson 1998). Neurone des parvozellulären Subkerns exprimieren Ob-Rb nur sehr schwach und reagieren nur moderat mit einer nukleären STAT3-Translokation auf zentral appliziertes Leptin (Tab. 21). PaV-Neurone synthetisieren neben Vasopressin, einem vasokonstriktorisch wirkendem Neuropeptid, sowohl anorexigene Stoffe wie z.B. CRH, TRH, GHRH, Oxytocin und CART, welches vor allem in TRH-ergen Neuronen synthetisiert wird (Broberger 1999), als auch orektisch wirkende Substanzen wie NPY und Orexin (1.9.1.). Durch retrogrades Tracing nach



viraler Infektion des braunen Fettgewebes, konnten Oldfield und Kollegen (2002) nachweisen, dass im PaV vor allem Oxytocin- aber weniger CRH-, CART sowie Vasopressin- und keine NPY- sowie Orexin-synthetisierende Neurone viral infiziert waren (Oldfield et al. 2002). Dorsale, ventrale und laterale parvozelluläre Neurone des PaV projizieren zu präganglionären sympathischen Neuronen in der *Medulla* und im Rückenmark (Saper et al. 1976, Sawchenko and Swanson 1983, Elias et al. 1998a). So hat der PaV direkte Efferenzen zum autonomen Nervensystem, was ebenfalls durch retrogrades Tracing bestätigt werden konnte (Bamshad et al. 1999, Oldfield et al. 2002, Cano et al. 2003, Yoshida et al. 2003). Auf diesem Wege kann durch Beeinflussung des Sympathikotonus die Thermogeneseleistung im braunen Fettgewebe moduliert werden (Foster et al. 1982). Interessanterweise riefen Mikroinjektionen von Leptin in den PaV, im Gegensatz zu Injektionen in den VMH oder DMH, keine kardiovaskulären Veränderungen hervor (Marsh et al. 2003). Neben der Beeinflussung des autonomen Nervensystems sind ventrale parvozelluläre Neurone des PaV in der Regulation der Motilität sowie Säuresekretion des Magens involviert (Rogers and Hermann 1985).

Das Releasing-Hormon CRH wird vor allem in parvozellulären Subkernen des PaV synthetisiert. Diese Neurone exprimieren sowohl NPY Y5- als auch MC<sub>4</sub>-Rezeptoren, was auf eine Interaktion zwischen dem CRH-System im PaV und dem NPY- sowie Melanocortin-System im ARC schließen lässt (Campbell et al. 2001, Lu et al. 2003). Auf diese Weise kann CRH erstens durch Melanocortin-Agonisten stimuliert werden (Lu et al. 2003), und zweitens reduziert es die NPY-vermittelte gesteigerte Nahrungsaufnahme (Heinrichs et al. 1993, Menzaghi et al. 1993). Eine zweite Interaktion besteht zwischen CRH und dem im ARC synthetisierten CART, welches die Aktivität von CRH-ergen Neuronen im PaV erhöht (Vrang et al. 2000). Das zur Familie des CRH gehörende Peptid Urocortin wird im Gegensatz zu CRH vor allem im magnozellulären Subkern des PaV, aber auch im SO und der LH synthetisiert (Richard et al. 2000).

Ein weiteres im PaV synthetisiertes Neuropeptid ist das TRH, welches wie CRH in periventrikulären und ventromedialen parvozellulären Neuronen synthetisiert wird (Legradi et al. 1997). Die Synthese von TRH wird einerseits durch POMC/CART-Neurone im lateralen ARC stimuliert und andererseits durch NPY/AgRP-Neurone im medialen ARC sowie durch MCH-Neurone in der LH gehemmt (Abb. 10). Sie projizieren ebenso wie CRH-Neurone in die *Medulla* zu parasympathischen und in das Rückenmark zu sympathischen präganglionären Neuronen und modulieren dadurch die Aktivität des autonomen Nervensystems.

Zusätzlich kommen im PaV Oxytocin-synthetisierende Neurone ebenfalls im parvozellulären Subkern vor. Auch sie projizieren zu autonomen präganglionären Neuronen in der *Medulla* (Sawchenko and Swanson 1982, Sawchenko 1987). Oxytocin als ein anorektisch wirkendes Peptid, neben seiner kontraktilen Wirkung auf das *Myometrium* und auf Korbzellen in der Milchdrüse, führte nach zentraler Applikation zu einer verminderten Nahrungsaufnahme, wohingegen i.c.v.-Injektionen von Oxytocin-Rezeptor-Antagonisten die Nahrungsaufnahme stimulierten (Arletti et al. 1989, 1990, Olson et al. 1991, Lokrantz et al. 1997, Blevins et al. 2002).

Die Wirkung von Leptin über den PaV, direkt über Leptin-responsive Zellen sowie indirekt über andere zum PaV projizierende hypothalamische Kerngebiete, kann neben einer sekretorischen Wirkung auf die Hypophyse (1.9.3.) in einer Verminderung der Nahrungsaufnahme und einer Stimulation der sympathischen Aktivität über das Rückenmark zusammengefasst werden.

#### ***1.10.5. Die Area laterale hypothalami (LH)***

Die LH gilt als eine weitere Struktur im *Hypothalamus*, die Leptin-responsiv ist. Ihre Neurone exprimieren die lange Leptin-Rezeptor-Isoform und reagieren auf zentral appliziertes Leptin mit einer moderaten nukleären STAT3-Translokation (Tab. 21). Dieses Kerngebiet liegt unmittelbar lateral der *Fornix*, geht auf Höhe –1,3mm von Bregma aus der lateralen präoptischen Region hervor und erstreckt sich über den gesamten *Hypothalamus* bis in etwa auf Höhe –4,8mm von Bregma (Abb. 4). Neurone der LH exprimieren das orektisch wirkende MCH (Bittencourt et al. 1992) und Orexin A und B (1.9.1.3. und 1.9.1.4.) (Sakurai 1999). Ein anorektisch wirkendes Peptid aus Neuronen der LH ist das Urocortin (Richard et al. 2000). Leptin-Rezeptoren sind nur schwach auf den Neuronen der LH ausgebildet (Fei et al. 1997, Elmquist et al. 1998a). So wirkt Leptin hauptsächlich über eine Beeinflussung der NPY/AgRP- und POMC/CART-Neurone im ARC auf die Synthese von MCH und Orexin (Elias et al. 1999).

MCH vermittelt seine Wirkung über MCH-Rezeptoren, die vor allem extrahypothalamisch aber auch hypothalamisch besonders im ARC, PaV, DMH und VMH vertreten sind (Saito et al. 1999, Hervieu et al. 2000). Versuche mit einer akuten und chronischen Infusion von MCH, eine Blockade der NPY Y1-Rezeptoren sowie retrogrades Tracing (Elias et al. 1999) haben gezeigt, dass MCH-erge Neurone wechselseitig mit NPY- und POMC-ergen Neuronen des ARC verschaltet sind. Eine MCH-Infusion induzierte die Bildung von NPY-mRNA, eine NPY Y1-Rezeptor-Blockade hemmte die MCH-induzierte gesteigerte Nahrungsaufnahme

(Broberger et al. 1998a, Chaffer and Morris 2002). Weiterhin interagierten MCH-Neurone einerseits mit TRH-synthetisierenden Neuronen im PaV, in welchen über eine Hemmung von cAMP durch den MCH-Rezeptor die TRH-Synthese inhibiert wurde (Kennedy et al. 2001) und andererseits mit Orexin-synthetisierenden Neuronen direkt in der LH (Bayer et al. 2002, Guan et al. 2002).

Orexin-erge Neurone liegen unmittelbar benachbart zu MCH-synthetisierenden Neuronen (Broberger et al. 1998a, Elias et al. 1998b). Sie projizieren im *Hypothalamus* zum ARC und zum PaV aber auch extrahypothalamisch ins Rückenmark (Abb. 10) (Cechetto and Saper 1988, Date et al. 1999, Cano et al. 2003, Geerling et al. 2003) und in den *Cortex cerebialis* (Saper 1985) sowie in periphere Gewebe (Nambu et al. 1999). Zentrale Applikationen von Orexin riefen eine erhöhte FOS-Immunreaktivität (felines Osteosarkomvirus-Onkogen Struktur-ähnliches Peptid) in NPY-synthetisierenden Neuronen des ARC hervor. Dies bedeutet, dass Orexin-erge Neurone in Wechselwirkung mit dem NPY-System im ARC stehen (Yamanaka et al. 2000). Interessanterweise gibt es aber auch Hinweise auf eine Wechselwirkung mit dem Melanocortin-System im ARC, was möglicherweise mit der Erhöhung der metabolischen Rate (Energieverbrauch) in Verbindung gebracht werden kann (Guan et al. 2001, Funahashi et al. 2003).

#### ***1.10.6. Die Area retrochiasmatica (RCH)***

Die RCH, als eine weitere Zielstruktur von Leptin, ist direkt caudal des Sch und cranial des ARC ventral des V<sub>III</sub>, direkt der *Decussatio supraoptici* (sox) aufliegend, lokalisiert. Sie erstreckt sich in etwa auf Höhe –1,6mm bis –1,9mm von Bregma (Paxinos and Watson 1998). Die Neurone der RCH exprimieren in einer mittleren Dichte die lange Form der Leptin-Rezeptoren und reagieren moderat bis stark auf zentral appliziertes Leptin mit einer nukleären STAT3-Translokation (Tab. 21). Sie kotsynthetisieren hauptsächlich POMC und CART, projizieren direkt ins Rückenmark zu autonomen präganglionären Neuronen und erhöhen dort die sympathische Aktivität (Swanson and Kuypers 1980, Cechetto and Saper 1988, Elias et al. 1998a, Koylu et al. 1998). Neben der Projektion ins Rückenmark konnte durch retrogrades Tracing die Existenz von Konnektivitäten zum PaV nachgewiesen werden (Fekete et al. 2004).

### 1.10.7. Der Nucleus praemamillaris ventralis (PMV)

Ein hypothalamisches Kerngebiet mit Neuronen, die sehr stark die lange und funktionelle Form der Leptin-Rezeptoren exprimieren, aber nur gering auf zentral appliziertes Leptin mit einer nukleären STAT3-Translokation antworten (Tab. 21), ist der PMV. Er beginnt in etwa auf Höhe -3,8mm von Bregma, wo der DMH und VMH bereits enden, und erstreckt sich bis ca. -4,3mm von Bregma. Er ist lateral des ARC und ventral der *Fornix* lokalisiert (Paxinos and Watson 1998). Neben dem ARC, der RCH und dem PaV synthetisieren auch Neurone des PMV CART (Couceyro et al. 1997, Koylu et al. 1997) und exprimieren sowohl Ob-Rb- als auch SOCS-3-mRNA, wodurch sie eine direkte Leptin-responsive Struktur darstellen (Bjorbaek et al. 1998a, Elias et al. 2001). Es gibt Hinweise auf eine Projektion von CART-Neuronen des PMV zum AVPe (vor allem in männlichen Individuen) und zu Regionen des *Hypothalamus*, die GnRH-synthetisierende Neurone enthalten (Abb. 11) (Canteras et al. 1992, Rondini et al. 2004). Sie stellen den hauptsächlichen Verbindungsweg für Leptin zum Reproduktionssystem her.

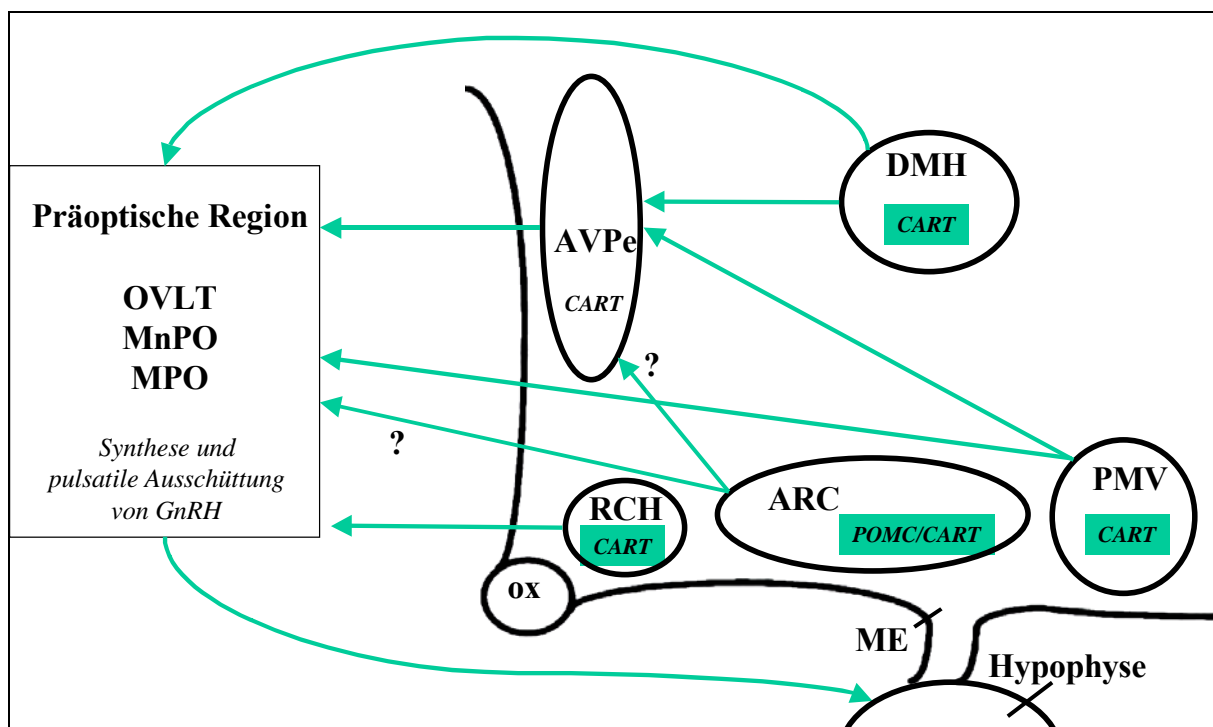


Abb. 11

Schematische Darstellung der Leptin-induzierten Beeinflussung der GnRH-Synthese und seiner pulsatilen Ausschüttung. Grün unterlegte Flächen deuten einen stimulierenden Einfluss von Leptin auf die Neurone in den jeweiligen hypothalamischen Kerngebieten an. Grüne geschlossene Pfeile symbolisieren die stimulierende Wirkung des jeweiligen Neuropeptids bzw. -transmitters. Erläuterungen im Text von 1.10.1. bis 1.10.7.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkung von Leptin im *Hypothalamus* durch sehr viele orektisch und anorektisch wirkende Peptide moduliert wird und so ein komplexes Netzwerk mit wechselseitiger Inhibition und Stimulation (Modulation) entsteht. Leptin modifiziert nicht nur die Genexpression dieser Peptide, sondern auch deren Wirkung nach ihrer Sekretion. Die morphologischen und funktionellen Interaktionen zwischen orexigenen und anorexigenen Neuronen deuten an, dass Leptin, um seine Rolle in der Regulation der Energie-Homöostase zu erfüllen, die gegenseitige Beeinflussung der orektischen und anorektischen Signale modifiziert. Als ein zweiter wichtiger hypothalamisch vermittelter Regulationsmechanismus ist die Interaktion von Neuropeptiden mit dem Reproduktionsgeschehen zu nennen. Auch in diesen Regelkreis greift Leptin über die Modulation von Neuropeptiden distinkter hypothalamischer Kerngebiete stimulierend ein.

### 1.11. Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit

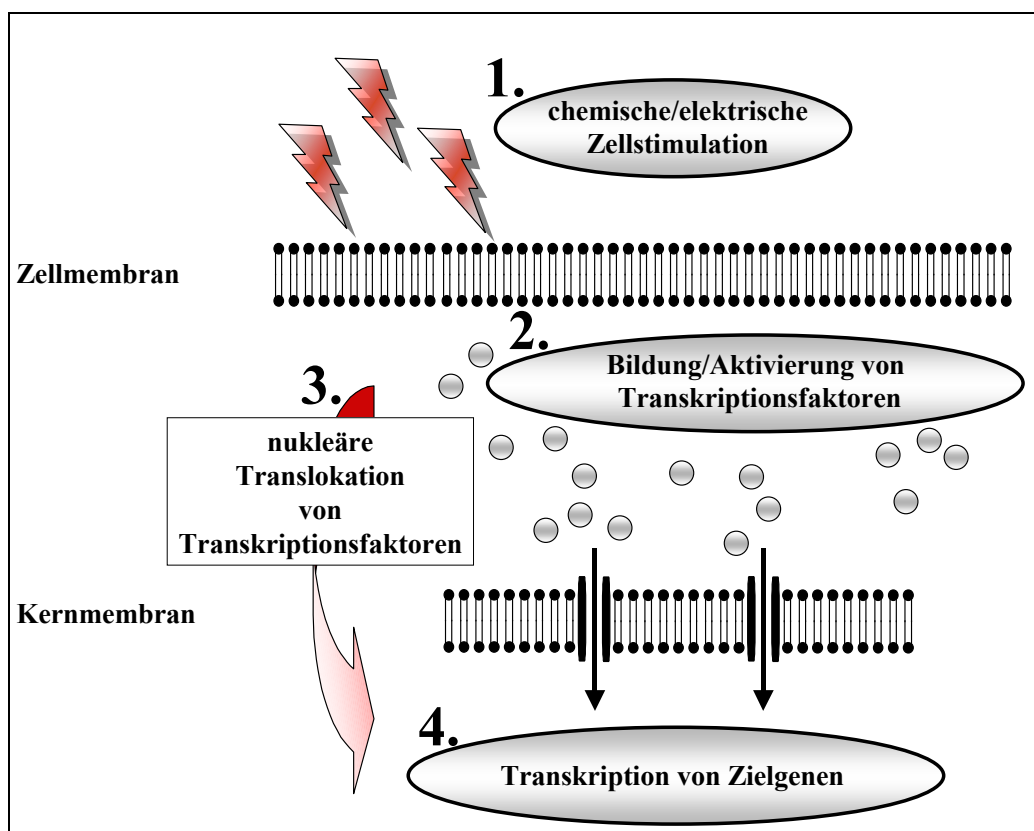


Abb. 12

Schematische Darstellung der durch einen externen Stimulus induzierten nukleären Translokation von Transkriptionsfaktoren. 1.: Ein chemischer oder elektrischer Reiz stimuliert die Zellmembran. 2.: Durch die stimulierten Strukturen in der Zellmembran kommt es zu Aktivierung und Bildung von Transkriptionsfaktoren (z.B. FOS oder STAT). 3.: Die Transkriptionsfaktoren wandern vom Zytoplasma in den Zellkern. 4.: Die Transkriptionsfaktoren modulieren an der DNA die Transkription von Zielgenen. Modifizierte Abbildung nach Hübschle (2004).

In dieser funktionell neuroanatomischen Arbeit sollen Lokalisation und Phänotyp Leptin-responsiver Zellen im Gehirn der Ratte nach systemischer Leptin-Applikation nachgewiesen werden. Eine vergleichbare Kartierung von Leptin-Zielstrukturen des Rattengehirns geschah bisher, neben der Detektion einer nukleären STAT3-Translokation nach zentraler und systemischer Applikation (Hübschle et al. 2001, Münzberg et al. 2003), nur mittels der Detektion des Transkriptionsfaktors „FOS“, einem Protein-Produkt des c-fos-Gens (Van Dijk et al. 1996, Elmquist et al. 1997, Elias et al. 1998a, Elmquist et al. 1998b, Elias et al. 2000). Der immunhistochemische Nachweis der nukleären Translokation des FOS-Proteins gilt als neuroanatomische Kartierungsmethode zur Bestimmung gesteigerter neuronaler Aktivität und dient damit der Kartierung von Effekten auf Nervenzellen (Chaudhuri 1997). Gesteigerte neuronale Aktivität nach Einwirkung eines externen Stimulus kann somit mit Hilfe von Proteinprodukten der „immediate early genes“, zu denen auch das Gen c-fos gehört, detektiert werden (Abb. 12). Sein Genprodukt das FOS-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der an spezifische Promotorregionen nachgeschalteter Gene („late genes“) bindet und deren Transkription beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit besteht das Hauptinteresse an der topographischen Charakterisierung der Leptin-aktivierten Hirnstrukturen und in der Phänotypisierung der Leptin-aktivierten Zellen.

| hypothalamische Kerngebiete                    | nukleäre FOS-Expression<br>systemische Leptin-Applikation | nukleäre STAT3-Expression<br>zentrale Leptin-Applikation | nukleäre STAT3-Expression<br>systemische Leptin-Applikation |
|--|---|--|---|
| DMH<br>(caudale Region)                        | +++   | +++  | positiv   |
| VMH<br>(dorsomedialer Subkern)                 | +++   | +++  | positiv   |
| ARC<br>(lateral Subkern)<br>(medialer Subkern) | ++  | +++  | positiv   |
|  | –   | +++  | positiv   |
| PaV<br>(parvozellulärer Subkern)               | +   | ++   | positiv   |
| PMV  | +   | +  | –   |
| RCH  | +   | ++   | –   |
| LH   | –   | ++   | positiv   |
| Pe   | –   | ++   | –   |
| PH   | –   | ++   | –   |

**Tab. 2**

Gegenüberstellung einiger hypothalamischer Kerngebiete der Ratte, die eine nukleäre FOS-Expression nach systemischer Leptin-Applikation und eine nukleäre STAT3-Translokation nach zentraler bzw. systemischer Leptin-Applikation zeigen (Elias et al. 2000, Hübschle et al. 2001, Münzberg et al. 2003). Die Bewertung der Expression wurde hier mittels einer semiquantitativen Bewertungsskala durchgeführt: +++ = starke, ++ = mittelstarke und + = schwache Expression. Speziell für die FOS-Expression gilt: +++ > 250, ++ > 100, + < 100 und – = keine positiven Zellen (Elias et al. 2000). In der Studie von Münzberg und Kollegen (2003) wurde keine quantitative Bewertung der STAT3-Signale vorgenommen.

Durch immunhistochemische Nachweise können solche Strukturen, die nach einem externen Stimulus (hier nach Leptingabe) mit einer Bildung und nukleären Translokation von Transkriptionsfaktoren reagieren, kartiert werden. Elias und Kollegen (2000) konnten eine Leptin-induzierte FOS-Aktivierung 2h nach systemischer (i.v.-) Leptin-Applikation (5mg/kg KM) in hypothalamischen Kerngebieten der Ratte nachweisen (Tab. 2). Insbesondere die caudale Region des DMH und der dorsomediale Subkern des VMH reagierten mit einer starken Aktivierung. Nur moderat wurde der laterale Anteil des ARC und nur schwach der PMV, die RCH sowie der parvozelluläre Subkern des PaV aktiviert (Elias et al. 2000). Dies konnte auch durch andere Studien belegt werden (Elmqvist et al. 1997, Elias et al. 1998a). Im Gegensatz dazu induzierte i.c.v.-appliziertes Leptin (3,5µg/Tier) auch in Neuronen der LH, des Pe und der *Area posterioris hypothalami* (PH) (Hübschle et al. 2001) und i.p.-appliziertes Leptin (1mg/kg KM) auch in der LH, aber nicht in der RCH, im PMV, im Pe und in der PH eine nukleäre STAT3-Translokation (Münzberg et al. 2003).

Dies zeigt klar, dass die neuroanatomische Kartierung von Leptin-Zielstrukturen mittels unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren (FOS im Vergleich zu STAT3) zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Es scheint, dass diese Differenzen nicht allein auf der unterschiedlichen Applikationsart von Leptin (systemisch im Vergleich zu zentral) basieren, sondern auch auf der Tatsache beruhen, dass eine FOS-Kartierung eine Leptin-Responsivität nur in aktivierten Nervenzellen nachweist. Daher sollte zum ersten Mal eine umfassende Kartierung (in der Studie von Münzberg und Kollegen (2003) wurde nur eine grobe Lokalisation nachgewiesen) und Phänotypisierung von Leptin-Zielstrukturen des Rattengehirns mit Mitgliedern der STAT-Familie (STAT3 und STAT5) nach systemischer Leptingabe durchgeführt werden. Die STAT3-Aktivierung ist für neuronale und viele nicht-neuronale Zellen des Gehirns beschrieben (Harré et al. 2003, Rummel et al. 2005). Der Nachweis der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation könnte also im Vergleich zur FOS-Methode zur besseren Charakterisierung der Zelltypen eingesetzt werden, die auf eine systemische Leptingabe hin aktiviert wurden. Eine Leptin-induzierte STAT5-Aktivierung in Zellen des Gehirns wurde bislang noch nicht untersucht. Daher wurde für die STAT5-Kartierung Leptin sowohl systemisch als auch zentral appliziert, auch um die Vergleichbarkeit mit den bisher durchgeführten Kartierungsstudien zu gewährleisten.

Basierend auf diesem Hintergrund sollen in der Arbeit folgende wissenschaftliche Fragen abgeklärt werden:

- Kann der immunhistochemische Nachweis einer durch systemische Leptin-Applikation induzierten nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors STAT3 in Strukturen des ZNS geführt werden, die an der hypothalamischen Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase beteiligt sind?
- Kann das nach zentraler Leptin-Applikation gefundene Verteilungsmuster der hypothalamischen STAT3-Aktivierung auch nach systemischer Leptin-Stimulation in vergleichbarer Intensität dokumentiert werden?
- Welche Zelltypen zeigen im ZNS eine solche Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation?
- Lässt sich eine bislang nur ausschließlich in peripheren Geweben gefundene Leptin-induzierte STAT5-Aktivierung auch im ZNS nachweisen?
- Wie sieht das Verteilungsmuster der nukleären STAT5-Translokation nach peripherer im Vergleich zur zentralen Stimulation mit Leptin aus, und ergeben sich Unterschiede zur Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation?
- Welche Zelltypen zeigen im ZNS eine solche Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation?



## **2. KAPITEL: Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

Für die Versuche wurden männliche Laborratten der Zuchtlinie Wistar aus einer Instituts-eigenen Zucht verwendet. Die Ratten wurden in klimatisch isolierten Räumen mit einer Raumtemperatur von  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  und einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden mit der Lichtphase von 7.00 Uhr bis 19.00 Uhr aufgezogen. Die Raumluft wurde durch eine Filteranlage von Staubpartikeln gereinigt und die Aufzuchtstation durfte nur desinfiziert betreten werden. Die Ratten verblieben bis zu einem Gewicht von  $110 \pm 10\text{g}$  im Käfig des Muttertieres (transparenter TypIV Polycarbonat-Käfig, FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmendingen, Größe 38 x 59 x 18cm). Diese Käfige wurden mit Altromin Animal-Bedding (FA. Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe) eingestreut. Beim Absetzen wurden die Tiere gemäß ihres Alters und Geschlechts in Kleingruppen von bis zu fünf Tieren in ebensolche Käfige umgesetzt. Dort verblieben sie bis zu einem Gewicht von  $250 \pm 50\text{g}$ . Futter (Pellets, FA. Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe) und Wasser wurde *ad libitum* angeboten. Am Tag der Operation (2.2.), bzw. der Stimulation (2.5.1.) wurden die Tiere einzeln in 28 x 42 x 15cm große, transparente TypIII Polycarbonat-Käfige (FA. Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, D-Emmendingen) umgesetzt und im Versuchsraum unter gleichen klimatischen Bedingungen und gleichem Licht-Rechime wie in der Aufzuchtstation gehalten. Die Versuche wurden mit der Genehmigung der lokalen Tierschutzkommission (Projektnummer GI 18/2 Nr. 42/2000) durchgeführt.

### **2.2. Operation**

Vor der Operation wurden die Tiere adspektorisch auf ihren Gesundheitszustand überprüft und durften keinerlei Hinweise auf ein gestörtes Allgemeinbefinden, Verletzungen oder andere Erkrankungen aufweisen. Die Operation fand mindestens 10 Tage vor der Stimulation statt, um dem Tier ausreichend Zeit zur Rekonvaleszenz und zur Gewöhnung an die neue Umgebung und insbesondere an die neue Wasserversorgung (2.2.3.) zu geben.

### 2.2.1. Narkose

Zur i.c.v.-Kanülierung (2.2.2.) war eine Allgemeinanästhesie angezeigt, um dem Tier über die Dauer der Operation Schmerzfreiheit zu garantieren und eine vollständige Muskelrelaxation zu erreichen. Um dies sicher zu stellen, wurden den Ratten 100mg/kg Körpermasse (KM) Ketaminhydrochlorid (Ketavet<sup>®</sup>, Pharmacia GmbH, D-Erlangen) kombiniert mit 5mg/kg KM Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Das Gemisch wurde dazu in einer sterilen 1ml Einweg-Mischspritze (BD Plastipak<sup>TM</sup>, Becton-Dickinson, Esp-Madrid) aufgezogen und mit einer sterilen 26G Einmal-Kanüle (Neoject<sup>®</sup> 0,45 x 13mm, Disposed Witt oHG, D-Gelnhausen) injiziert. Das Ausbleiben der Flexorenreflexe an den Gliedmaßen, welches durch setzen eines Druckschmerzes im Bereich der Zwischenzehen mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette überprüft wurde, diente als Beweis für eine ausreichende Narkosetiefe. Diese hielt ungefähr 90min lang an, wobei in Einzelfällen eine Nachdosierung mit Ketaminhydrochlorid in einer Dosierung von 50mg/kg KM nötig war. Zusätzlich wurde den Ratten eine Augensalbe (Bepanthen<sup>®</sup>, Hoffman-La Roche AG, D-Grenzach-Wyhlen) zum Feuchthalten der *Cornea* auf die Augen gegeben. Die Operation dauerte ca. 60min. Die Ratten waren innerhalb von 2h wieder wach.

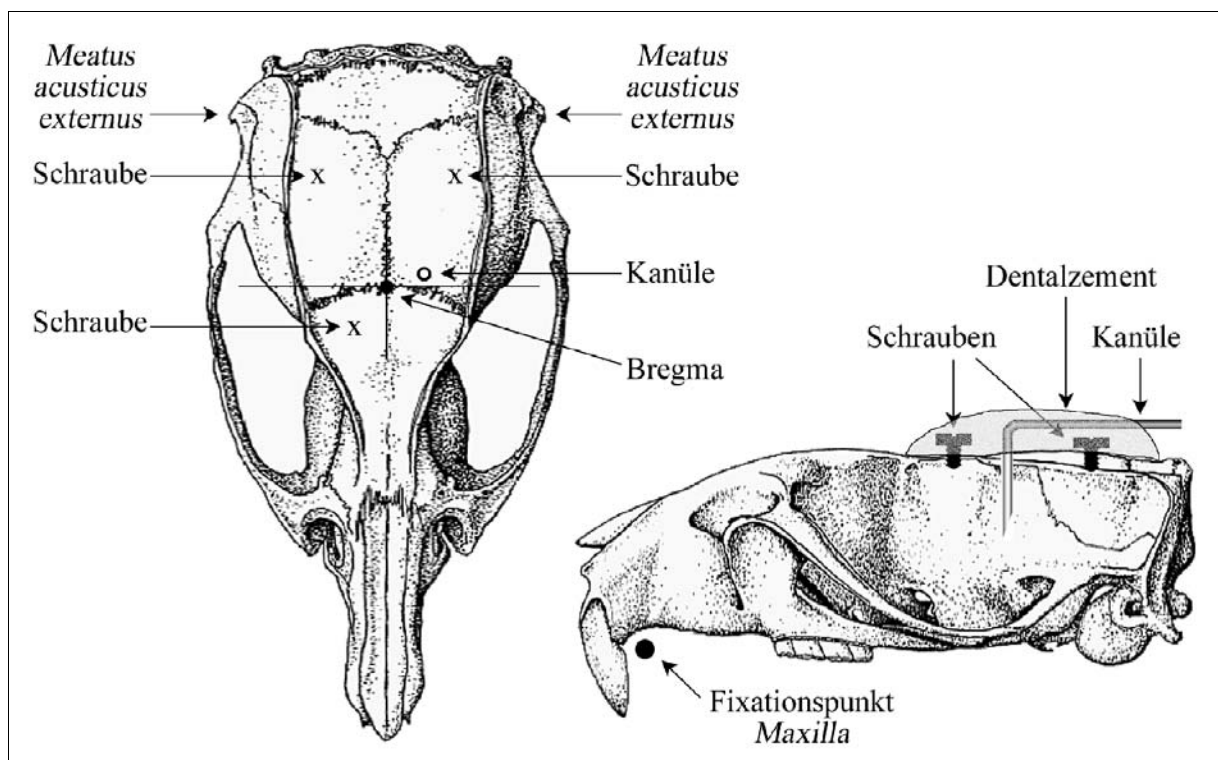
### 2.2.2. i.c.v.-Kanülierung des *Ventriculus lateralis* ( $V_l$ )

Zunächst wurde das Operationsfeld vorbereitet. Hierzu wurden die Haare im Bereich zwischen den Ohren und Augen geschoren, rasiert und anschließend mit 70%igem Ethanol entfettet und desinfiziert. Daraufhin folgte die Fixation des Kopfes im Stereotakt (Kopf Instruments, USA). Hierzu wurden zwei Stahlstäbe jeweils seitlich in die *Meati acustici externi* positioniert und über eine Skala mittig fixiert. Dies verhinderte ein seitliches Ausweichen des Schädels während der Operation und gewährleistete eine zentrale Lage des Schädels im Stereotakt. Zusätzlich wurde der Oberkiefer so eingespannt, dass der *Angulus oculus anterior* in der Horizontallinie, die durch den Mittelpunkt des *Meatus acusticus externus* geht, zu liegen kam. Während der Operation lagen die Ratten auf einem Wärmekissen (Fine Science Tools Inc., D-Heidelberg), das stets eine Temperatur von 37°C gewährleistete, so dass die Ratten nicht auskühlten. In regelmäßigen Abständen wurde die Narkosetiefe durch Auslösen der Flexorenreflexe überprüft.

Die Operation wurde mit einem Hautschnitt, der in der Medianen zwischen den Augen begann und zwischen den Ohren endete, eingeleitet. Nach der Mobilisierung der Haut wurde

der Schädelknochen von sämtlichen Gewebeanteilen befreit. Um den Wundspalt offen zu halten wurden zwei Haken unter die Wundränder gelegt und nach lateral gespreizt. Zur Blutstillung wurden die Gefäße mit 10%igem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ , Merck, D-Darmstadt) koaguliert und so eine bessere Übersicht im Operationsfeld erreicht. Zur Positionierung der Kanüle (institutseigene Herstellung aus einer 23G Einmal-Kanüle, Luer 0,6 x 30mm, D-Tuttlingen, Abb. 14) musste zunächst der Bregma-Punkt festgelegt werden. Bregma ist der Punkt, an welchem sich die *Sutura sagitalis*, die sich nach caudal in die *Sutura interfrontalis* fortsetzt, und die *Sutura coronalis* kreuzen (Abb. 13, Schädelaufricht). Die Koordinaten für die Position der Kanüle basierten auf der Grundlage des stereotaktischen Gehirnatlas für Ratten (Paxinos and Watson 1998) und wurden wie folgt definiert:

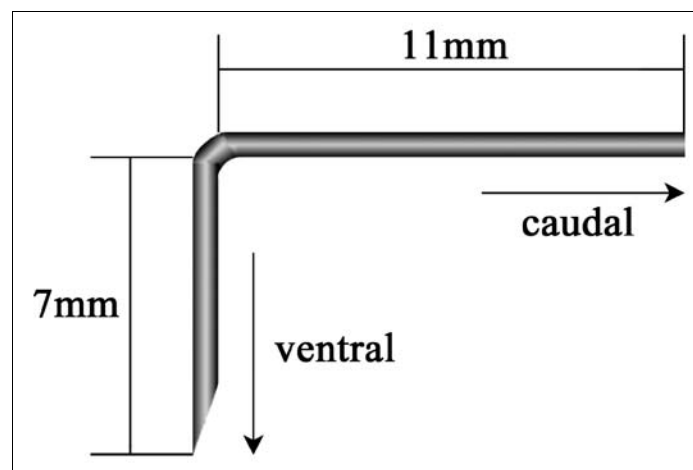
**posterior:** von Bregma aus 0,4mm nach caudal  
**lateral:** von Bregma aus 1,5mm nach links  
**ventral:** ab der *Dura mater* 4mm in die Tiefe



**Abb. 13**

links: Skizze eines Rattenschädels (Aufsicht) mit Markierung des Orientierungspunktes Bregma (●) und die Darstellung der Position der Kanüle (○) sowie der Schrauben (x). rechts: Skizze eines Rattenschädels (laterale Ansicht) mit Darstellung der Schrauben, der Kanüle, des Dentalzements sowie der Markierung des Fixationspunktes (●) für den Stereotakt am Oberkiefer. Modifizierte Abbildung nach Paxinos and Watson (1998).

Vom Bregma-Punkt aus wurden die Koordinaten im Stereotakt eingestellt und somit die Position für die Kanüle ermittelt. Dieser Punkt wurde auf der Knochenplatte markiert und exakt an dieser Stelle ein Loch mit einem Durchmesser von ca. 2mm mit Hilfe eines Dentalbohrers (Fine Science Tools, D-Heidelberg) in den Schädelknochen bis auf die *Dura mater* gebohrt. Zusätzlich mussten, wie in Abb. 13 gezeigt, drei Löcher für die Schrauben (A4, M1 (4 x 2), FMI GmbH, D-Seeheim) vorgebohrt und diese so tief in den Knochen eingedreht werden bis sie fest saßen. Die Schrauben dienten der Befestigung der Kanüle im Dentalzement (Polymethylacrylat, Palacos®, Merck, D-Darmstadt, Abb. 13). Nachdem die Schrauben gut befestigt waren, wurde die Kanüle mit Hilfe eines am Stereotakten befestigten Halters (Kopf Instruments, USA) langsam 4mm tief in das Hirngewebe gesenkt, wobei das Ende nach caudal zeigte (Abb. 13). Die angeschrägte Kanülenöffnung (Abb. 14) wurde dadurch im *Ventriculus lateralis* (V<sub>l</sub>) platziert.



**Abb. 14**  
Schematische Darstellung der institutseigenen i.c.v.-Kanüle (hergestellt aus einer 23G, 0,6 x 30mm Einmal-Kanüle, Luer, D-Tuttlingen).

Nun wurde die Kanüle mittels Dentalzement fixiert, indem sowohl die Schrauben als auch die Schädeldecke im gesamten Wundbereich einzementiert wurde. Der Zement reichte über den rechten Winkel der Kanüle hinaus bis etwa 5mm vor das caudale Ende (Abb. 13). Beim Aushärten wurde darauf geachtet, dass die Haut frei beweglich blieb. Dann wurde die Kanüle aus der Führungseinheit genommen und die Ratten aus dem Stereotakt ausgespannt. Auf das caudale, freie Ende der Kanüle wurde dann ein 1cm langer, an einem Ende zugeschweißter, Polypropylenschlauch (PP20, Portex, UK-Hythe) aufgeschoben, der das offene Ende der Kanüle verschloss. Anschließend wurden die Ratten bis zum Aufwachen unter eine Wärmelampe gelegt und für ca. 10 Tage täglich zur gleichen Tageszeit auf Wasser- sowie Futteraufnahme und Körpergewicht kontrolliert.

### 2.2.3. Angiotensin-II-Trinktest

Am neunten Tag *post operationem*, wurde ein Angiotensin-II-Trinktest durchgeführt. Mit diesem Test wurde der richtige Sitz der Kanüle im linken  $V_1$  funktionell überprüft. Durch die i.c.v.-Applikation von humanem Angiotensin-II (Sigma Chemicals, D-Deisenhofen, Tab. 3), gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung mit einer Konzentration von 25ng/ $\mu$ l, welches stark dipsogen wirkte, konnte bei richtiger Platzierung der Kanüle eine sofortige Trinkantwort bei den Tieren ausgelöst werden. Zur Aufzeichnung der Wasseraufnahme pro Zeiteinheit wurden die Tränkeflaschen auf Waagen gestellt und diese wiederum mit einem Computer verschaltet. Die Flaschen standen über einen Schlauch, der am Ende mit einem druckempfindlichen Tränkenippel versehen war, mit dem Rattenkäfig in Verbindung. Während der neuntägigen Rekonvaleszenzzeit gewöhnten sich die Ratten an diese neue Art der Wasserversorgung. Zur i.c.v.-Applikation wurde ein Polypropylenschlauch (PP20, Portex, UK-Hythe) mit 2 $\mu$ l pyrogenfreier, isotoner Kochsalzlösung (0,9%ige NaCl-Lösung, Braun, D-Melsungen, Tab. 3) zum Spülen der Kanüle, 2 $\mu$ l Angiotensin-II (25ng/ $\mu$ l) zur Stimulation und 1 $\mu$ l NaCl zum Nachspülen mit jeweils einer kleinen Luftblase zwischen den Lösungen mit Hilfe einer 10 $\mu$ l-Mehrweg-Spritze (Hamilton Bonaduz AG, CH-Bonaduz) gefüllt und mit dem caudalen Ende der Kanüle verbunden. Nach der Applikation des Gesamtvolumens von 5 $\mu$ l über einen Zeitraum von 30 bis 60sec wurde der Polypropylenschlauch von dem Kanülenende entfernt und die Kanüle mit einem 1cm langen, zugeschweißten Polypropylenschlauch verschlossen und die Ratten zurück in ihre Käfige gesetzt. Nun wurde das Trinkverhalten jeder Ratte über 1h minütlich mit Hilfe des Computerprogramms Accudiet (Accuscan Instruments Inc., Omnitech, USA-Ohio) aufgezeichnet. War die Kanüle richtig platziert, kam es sofort nach der Applikation zum Auslösen des Trinkverhaltens bei einer Wasseraufnahme von mindestens 8g/30min. Begann die Wasseraufnahme verzögert, das heißt mit einem Einsetzen frühestens 10min nach der Stimulation, oder wurde weniger als 8g Wasser in den ersten 30min aufgenommen, führte dies zum Ausschluss der Ratten vom weiteren Versuch, da dies auf einen inkorrekten Sitz der Kanüle hindeutete.

## 2.3. Verwendete Substanzen

| Bezeichnung         | Substanz                                     | Hersteller  |
|---------------------|--|---|
| Angiotensin-II      | humanes Angiotensin-II                       | Sigma Chemicals,<br>D-Deisenhofen                       |
| Leptin              | rekombinantes murines Leptin<br>(aus E.coli) | Aventis Pharma<br>Deutschland GmbH,<br>D-Frankfurt/Main |
| 0,9%ige NaCl-Lösung | pyrogenfreie,<br>isotonische Kochsalzlösung  | Braun,<br>D-Melsungen                                   |

**Tab. 3**

**Übersicht über die in den Versuchen verwendeten Substanzen sowie ihre Bezeichnung und ihre Hersteller.**

### 2.3.1. *Leptin*

Bei dem in den Experimenten verwendeten Leptin handelte es sich um rekombinantes murines Leptin aus E.coli mit der Molmasse 17,57kDa (Aventis Pharma Deutschland GmbH, D-Frankfurt/Main, Tab. 3). 1,753mg der Reinsubstanz wurden in 1ml steriler, filtrierter Phosphat-Puffer-Lösung (PBS, 9g NaCl auf 1ml 0,1M PO<sub>4</sub>-Puffer (PB), pH 7,4, 2.4.) ohne Konservierungsstoffe gelöst (die Lösung entspricht einer Konzentration von 1,753µg/µl). Diese Lösung wurde bei –40°C gelagert. Zur i.c.v.-Applikation wurden Aliquots mit einem Volumen von je 15µl und für die i.p.-Applikation Aliquots mit einem Volumen von je 713µl angelegt und ebenfalls bei –40°C gelagert.

### 2.3.2. *Pyrogenfreie, isotonische Kochsalzlösung zur Applikation*

Neben der Verwendung als Mischsubstanz wurde die 0,9%ige NaCl-Lösung mit einem Volumen von 2µl/Tier für die i.c.v.-Applikation und 1ml/Tier für die i.p.-Applikation als Kontrollsubstanz für die Versuche verwendet. Für die zentrale Applikationsform wurden Aliquots mit einem Volumen von je 500µl angelegt und bei –40°C gelagert.

## 2.4. Verwendete Lösungen und Puffer

| Bezeichnung        |                                  | Substanz                  | Hersteller         |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------|
| PB                 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Dinatriumhydrogenphosphat | Merck, D-Darmstadt |
|                    | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Natriumdihydrogenphosphat | Merck, D-Darmstadt |
| PBS                |                                  | 9g NaCl/1ml PB            | Merck, D-Darmstadt |
| PFA                |                                  | Paraformaldehyd           | Merck, D-Darmstadt |
| Sucrose            |                                  | Saccharoselösung          | Merck, D-Darmstadt |
| 0,9% NaCl (Saline) |                                  | 0,9% Natriumchlorid       | Merck, D-Darmstadt |

**Tab. 4**

Übersicht über die Grundsubstanzen, die zur Herstellung der in den Versuchen verwendeten Lösungen und Puffer benötigt wurden sowie ihre Bezeichnung und Hersteller.

### 2.4.1. Phosphatpuffer (PB)

Der Phosphatpuffer, welcher für die immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirnschnitte benötigt wurde, wurde aus zwei Stocklösungen angesetzt. Die Erste (Stocklösung A, Tab. 4) bestand aus einer 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (MG: 137,99g/Mol, 27,6g/l *Aqua bidest.*), die Zweite (Stocklösung B, Tab. 4) aus einer 0,2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (MG: 177,99g/Mol, 35,6g/l *Aqua bidest.*). Um 2l eines gebrauchsfertigen PB herzustellen, wurden 280ml der Stocklösung A mit 720ml der Stocklösung B gemischt und anschließend mit 1l *Aqua bidest.* (Milli-Q<sub>plus</sub>, Millipore, F-Molsheim) auf ein Volumen von 2l aufgefüllt. Nach gutem Durchmischen wurde der pH-Wert mit einem pH-Indikatorpapier (pH-Bereich 6,4 bis 8,0, Macherey-Nagel, D-Düren) überprüft. Dieser musste zwischen pH 7,2 und 7,4 liegen.

### 2.4.2. Paraformaldehyd- (PFA) Lösung

Für die direkte Fixierung der Gehirne während der Perfusion („free-floating-Methode“, 2.8.3.2.) wurde eine 4%ige PFA-Lösung benötigt. Hierzu wurden 40g reinstes PFA (Tab. 4) unter dem Abzug abgewogen und in 1l PB bei 120-150°C unter ständigem Rühren gelöst. Das Pulver war dann optimal in Lösung gegangen, sobald die Flüssigkeit völlig klar erschien. Anschließend wurde die Lösung wieder auf ein exaktes Volumen von 1l mit PB aufgefüllt, filtriert und auf Eis gelagert, bis eine Temperatur von +4°C erreicht wurde. Der pH-Wert, der mittels pH-Indikatorpapier überprüft wurde, musste zwischen pH 7,2 und 7,4 liegen.

Zur Fixierung des Gehirns nach dem Schneiden am Kryostaten („Fluoreszenz-Methode“, 2.8.3.3.) wurde eine 2%ige PFA-Lösung benötigt. Hierzu wurden nur 20g PFA/l PB gelöst.

### **2.4.3. Saccharoselösung (Sucrose)**

Die Gehirne wurden vor dem Schneiden zum kryoprotektiven Schutz in 20%ige Sucrose eingelegt. Für eine 20%ige Lösung wurden 20g Saccharose (Tab. 4) in 100ml PB bei ständigem Umrühren gelöst. Nach vollständigem Lösen der Saccharose wurde die Lösung bis zur Verwendung bei +4°C gelagert.

### **2.4.4. Isotonische Kochsalzlösung (Saline) zur Perfusion**

Um sämtliches Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen, wurden die Ratten mit 0,9%iger Kochsalzlösung perfundiert. Um eine 0,9%ige Lösung herzustellen (physiologisch, Tab. 4) wurden 9g NaCl in 1l *Aqua bidest.* unter ständigem Rühren gelöst und bei Raumtemperatur bis zur Verwendung aufbewahrt.

## **2.5. Durchführung der Tierversuche**

Für die Tierversuche mussten die Ratten ein Gewicht von  $275 \pm 75$ g erreicht haben. Bei der Stimulation wurde darauf geachtet, dass die Tiere ruhig behandelt wurden, um so wenig Stress wie möglich auszulösen.

### **2.5.1. Stimulation der Versuchstiere**

Die Stimulation mit den jeweiligen Substanzen erfolgte am wachen Tier einerseits zentral (i.c.v.) durch die zuvor eingesetzte Kanüle direkt in den  $V_1$  (2.5.1.1.) oder systemisch (i.p.) durch die Injektion in die Bauchhöhle (2.5.1.2.).

#### **2.5.1.1. Zentrale Stimulation (i.c.v.)**

Zur Applikation in den linken  $V_1$  des Gehirns wurden die Substanzen Leptin bzw. 0,9% pyrogenfreie NaCl-Lösung (2.3.) auf die gleiche Weise verabreicht wie es für Angiotensin-II in 2.2.3. beschrieben wurde. Hierzu wurde ein Polypropylenschlauch (PP20, Portex, UK-Hythe) mit 2µl pyrogenfreier, isotoner Kochsalzlösung (Tab. 3) zum Spülen der Kanüle, 2µl Leptin in einer Konzentration von 1,753µg/µl (Tab. 3) bzw. 2µl 0,9%ige NaCl-Lösung zur Stimulation und schließlich 1µl 0,9%ige NaCl-Lösung zum Nachspülen mit jeweils einer kleinen Luftblase zwischen den Lösungen mit Hilfe einer 10µl-Mehrweg-Spritze (Hamilton



Bonaduz AG, CH-Bonaduz) gefüllt und mit dem caudalen Ende der Kanüle verbunden. Nach der Applikation des Gesamtvolumens von 5µl über einen Zeitraum von 30 bis 60sec wurde der Polypropylenschlauch vom Kanülenende entfernt und die Kanüle mit einem 1cm langen, zugeschweißten Polypropylenschlauch verschlossen und die Ratten in ihre Käfige zurückgesetzt. Nun wurde der Zeitpunkt der Applikation festgehalten.

#### **2.5.1.2. Systemische Stimulation (i.p.)**

Bei dieser Applikationsform wurden die jeweiligen Substanzen i.p. injiziert. Die Substanzen Leptin bzw. 0,9%ige NaCl-Lösung (beide in Tab. 3) wurden mit je einem Volumen von 1ml (die 713µl Leptin eines Aliquots wurden mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 1ml aufgefüllt) in eine sterile Einmalspritze (BD Plastipak, Becton-Dickinson, D-Heidelberg) aufgezogen und mit Hilfe einer 26G Einmal-Kanüle (Neoject® 0,45 x 13mm, Dispomed Witt oHG, D-Gelnhausen) in die Bauchhöhle appliziert. Die Dosierung für Leptin betrug 5mg/kg KM. Vor der Injektion wurde aspiriert, um einer Applikation in den Darm oder direkt in das Blutgefäßsystem zu vermeiden. Das Volumen wurde bei jedem Tier zu einer Hälfte (500µl) in die linke und zur anderen Hälfte in die rechte Seite der Bauchhöhle injiziert, um so eine bessere Verteilung zu erreichen. Nach der Applikation wurden die Ratten wieder in ihre Käfige gesetzt und der Zeitpunkt der Injektion festgehalten.

#### **2.5.2. Perfusion**

Nachdem die jeweiligen Stimulationszeiten (30, 60, 90, 120, 150, 180 und 240min) abgelaufen waren, wurden die Ratten in Narkose gelegt. Da eine sehr tiefe Narkose für die Perfusion nötig war, wurden 0,1ml Pentobarbital/100g KM (Narcoren®, Merial GmbH, D-Hallbergmoos) mittels einer 26G Einmal-Kanüle (Neoject® 0,45 x 13mm, Dispomed Witt oHG, D-Gelnhausen) i.p. appliziert. War eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, was durch das Ausbleiben der Flexorenreflexe beim Setzen eines Schmerzes in den Zwischenzehenspalt angezeigt wurde, wurden die Ratten in Rückenlage auf einen Gitterrost über einer Wanne fixiert. Nach nochmaliger Überprüfung der Flexorenreflexe wurde die Brusthöhle eröffnet und ein freier Zugang zum Herzen gelegt. Dann wurde das *Pericard* eröffnet und eine 18G Einmal-Kanüle (Sterican® 1,2 x 40mm, B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen) über die Herzspitze in den *Ventriculus sinister* geschoben. Vor der Perfusion wurde 1ml Blut mit einer heparinisierten (0,01ml Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Merckle GmbH, D-Blaubeuren) Einmal-Spritze (BD Plastipak™, Becton-Dickinson, Esp-Madrid) aus dem linken Ventrikel

entnommen. Danach wurde die Einmal-Spritze gegen einen Gummischlauch, der mit der Perfusionsapparatur verbunden war, ausgetauscht und nach Eröffnen des *Atrium dexter* das Ventil für die Perfusionslösung (Saline, 2.4.) geöffnet. Von dieser Lösung liefen etwa 300ml mit einem Druck von 130 bis 160mmHg über den linken Ventrikel durch den Körperkreislauf zurück zum Herzen in den eröffneten rechten Vorhof. War die Flüssigkeit, die aus dem rechten Vorhof abfloss, makroskopisch klar, war eine ausreichende Perfusion der Tiere erreicht. Nun wurde bei den Tieren, deren Gehirn immunhistochemisch mit der „free-floating-Methode“ (2.8.3.2.) aufgearbeitet wurde, eine Fixierung der Gewebe direkt angeschlossen. Hierzu wurden die Ratten zusätzlich mit etwa 300ml 4%iger PFA-Lösung (2.4.) bei einem Druck von 130-160mmHg, in der gleichen Weise wie zuvor mit der Saline-Lösung, durchspült. Dies wurde bei den Tieren nicht durchgeführt, deren Gehirn immunhistochemisch mit der „Fluoreszenz-Methode“ (2.8.3.3.) analysiert wurde.

Während der Perfusion wurden die Blutproben durch eine zweite Person sofort in 1,5ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf Netheler + Hinz GmbH, D-Hamburg) überführt und bei 7000 U/min für 3min in einer Microzentrifuge (MicroV, Fisher Scientific, Denver Instrument Company, USA-Denver) zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert, in ein 1ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf Netheler + Hinz GmbH, D-Hamburg) gegeben und bei -40°C eingefroren und gelagert.

## 2.6. Präparation der Gehirne

Unmittelbar nach der Perfusion wurden die Gehirne präpariert. Hierzu wurde die Kopfhaut von den Augen bis zu den Schulterblättern mit einem Skalpell (Aesculap®, BB 522, Aesculap AG & Co. KG, D-Tuttlingen) eröffnet und die Wirbelsäule im *Spatium intervertebralis* auf Höhe des zweiten und dritten Halswirbels quer durchtrennt. Die freiliegende Muskulatur wurde von dem Schädelknochen abgelöst. Nun konnte das Gehirn von der *Medulla oblongata* aus nach rostral freipräpariert und mit Hilfe eines Spatels vorsichtig herausgelöst werden. Dabei durfte der *Hypothalamus* keinesfalls beschädigt werden. Sämtliche Nervenstränge wurden mit einer kleinen Schere direkt am Durchtrittspunkt durch die Schädelbasis abgetrennt. Bei der immunhistochemischen Analyse wurden zwei Verfahren angewandt, einmal die „free-floating-Methode“ (2.8.3.2.) und zum anderen die „Fluoreszenz-Methode“ (2.8.3.3.). Aufgrund dessen wurden die Gehirne im folgenden unterschiedlich behandelt.

### 2.6.1. Aufbereitung für die „free-floating-Methode“

Die Gehirne, welche für die „free-floating-Methode“ (2.8.3.2.) genutzt wurden, wurden direkt nach der Entnahme aus der Schädelhöhle in 30ml Schraubgefäße mit 20ml 4%iger PFA-Lösung (2.4.) zum nachfixieren überführt. In dieser Lösung verblieben sie für 1h bei +4°C. Anschließend wurden die Gehirne in 20ml 20%ige Sucrose (2.4.) gegeben, in welcher sie ebenfalls bei +4°C solange verblieben, bis sie auf den Boden des Gefäßes abgesunken waren. Dies war in der Regel über Nacht gewährleistet. Die mit Sucrose gesättigten Gehirne waren so vor möglichen Gefrierschäden geschützt und konnten weiter histologisch aufgearbeitet werden.

### 2.6.2. Aufbereitung für die „Fluoreszenz-Methode“

Die Gehirne, welche mittels der „Fluoreszenz-Methode“ (2.8.3.3.) analysiert wurden, wurden nach der Entnahme aus der Schädelhöhle in der *Fissura transversa cerebri* durchtrennt und beide Teile sofort in pulverisiertem Trockeneis bei ca. -78°C eingefroren. Daraufhin wurden sie über Nacht bei -20°C gelagert, bevor mit dem Schneiden begonnen werden konnte.

## 2.7. Schneiden der Gehirne

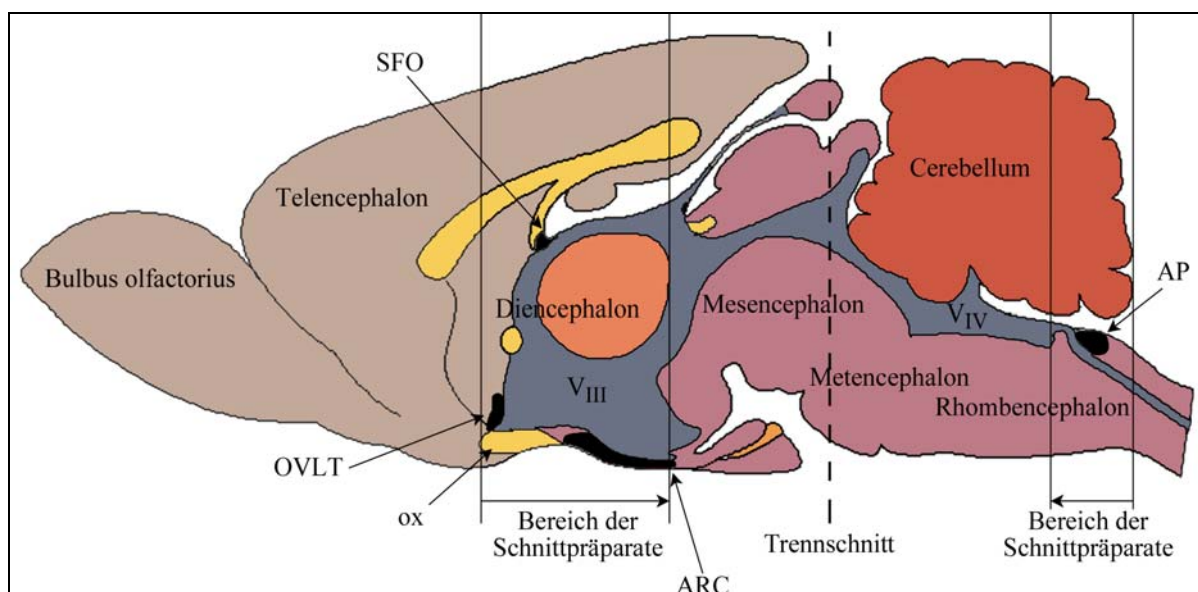


Abb. 15

Skizze eines Rattengehirns im Längsschnitt durch die Mediane mit Darstellung der Schnittbereiche und einigen hypothalamischen Regionen. SFO = *Organum subfornicale*; OVLT = *Organum vasculosum der Lamina terminalis*; ox = *Chiasma opticum*; ARC = *Nucleus arcuatus*; AP = *Area postrema*; V<sub>III</sub> = *Ventriculus tertius* und V<sub>IV</sub> = *Ventriculus quartus*.

Von allen Gehirnen wurden Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnittbereiche erstreckten sich im *Diencephalon* vom *Chiasma opticum* bis rostral des *Corpus mamillare* (Abb. 15). In diesem Bereich wurde von rostral nach caudal geschnitten. Im *Myelencephalon* wurde vom Beginn des *Cerebellums* auf Höhe des *Obex* bis zum *Tractus tectospinalis* von caudal nach rostral geschnitten.

### **2.7.1. Schneiden für die „free-floating-Methode“**

Zunächst wurden die Gehirne, welche in 20%iger Sucrose (2.4.) bei +4°C im Kühlschrank gelagert wurden, in der *Fissura transversa cerebri* (Abb. 15) mit einem Skalpell durchtrennt. Die Vorderhirne wurden mit ihrer caudalen, die Hirnstämme mit ihrer rostralen Schnittfläche auf den Objekthalter des Mikrotoms (R. Jung, D-Heidelberg) mit Einbettmedium (Tissue freezing Medium<sup>TM</sup>, Jung, Leica Instruments GmbH, D-Nussloch) aufgeblickt und mit Hilfe von CO<sub>2</sub>-Gas durch den Objekthalter eingefroren. Beim Aufblocken musste darauf geachtet werden, dass die Gehirne im rechten Winkel zur Objekthalteroberfläche ausgerichtet waren. Nachdem die Gehirne vollständig eingefroren waren, wurden sie in 40µm dünne Schnittpräparate geschnitten. Die Schnittführung durch das Vorderhirn erfolgte von dorsal nach ventral, damit das Messer nicht direkt auf den *Hypothalamus* stieß. Die Schnittführung im Hirnstamm erfolgte von ventral nach dorsal. Die Schnitte wurden ihrer Reihenfolge nach in Sektoren eines „Karussels“ (institutseigene Herstellung, Durchmesser 12cm, Höhe 5cm) gesammelt. Solch ein Karusell bestand aus transparentem Polycarbonat und war in acht Sektoren unterteilt. An ihrer Unterseite war ein Polyethylennetz aufgeklebt, durch welches Flüssigkeit in das Karusell ein- und austreten konnte. Diese Karusells wurden dann samt Schnittpräparaten in Glasschalen gestellt (Schott Duran, D., Durchmesser 14cm, Höhe 7,5cm), die mit 100ml PB gefüllt waren. Nun konnte mit der Immunhistochemie begonnen werden.

### **2.7.2. Schneiden für die „Fluoreszenz-Methode“**

Die Gehirne für die „Fluoreszenz-Methode“ (2.8.3.3.) wurden am Folgetag der Perfusion mit einem Kryostaten (Microm HM 500 O, Microm GmbH, D-Walldorf) geschnitten. Zuerst wurden die Vorderhirne im gefrorenen Zustand mit ihrer caudalen Schnittfläche auf dem Objekthalter mittels Einbettmedium (Tissue freezing Medium<sup>TM</sup>, Jung, Leica Instruments GmbH, D-Nussloch) aufgeblickt und dann mit der Gefriervorrichtung festgefroren. Nachdem das Einbettmedium vollständig fest geworden war, wurde der Objekthalter in der zum

Schneiden vorgesehenen Halterung eingespannt und so zur Klinge ausgerichtet, dass die Längsachse des Gehirns senkrecht zur Schnittfläche stand. Erst jetzt konnte mit dem Schneiden von 20µm dicken Schnitten begonnen werden. Auf die gleiche Weise wurde mit den Hirnstämmen verfahren, die allerdings mit ihrer rostralen Schnittfläche aufgeblockt wurden. Auch bei dieser Methode war die Schnittführung beim Vorderhirn von dorsal nach ventral und beim Hirnstamm von ventral nach dorsal. Teilweise wurden pro Tier zwei Schnittserien mit jeweils jedem zweiten Schnitt angefertigt, um an einer Serie die STAT5- und an der anderen die STAT3-Methode anzuwenden. Auf diese Weise wurden Tierzahlen gering gehalten. Alle Schnitte wurden direkt mit Poly-L-Lysin (Sigma Chemicals, St.Louis, MO, USA) beschichteten Objektträgern aufgenommen, in Objektträgerhaltern mit 25 Objektträgern gesammelt und bei +4°C im Kühlschrank für eine Nacht aufbewahrt.

## **2.8. Analyse der Gehirnproben**

### ***2.8.1. Grundlage der Immunhistochemie***

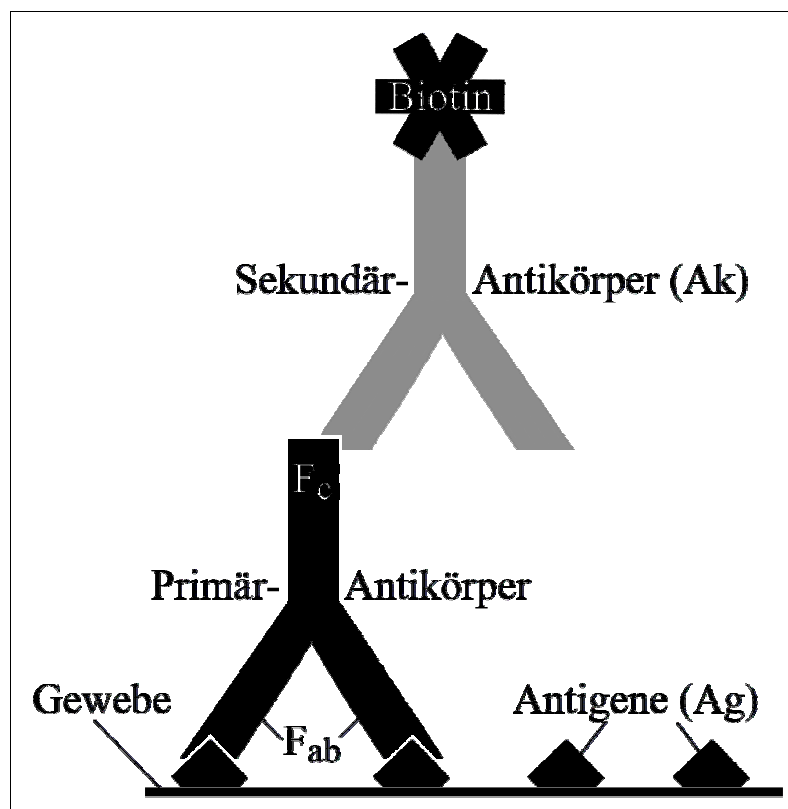
Zur Analyse der Gehirnproben wurden immunhistochemische Methoden angewandt. Die Grundlage der Immunhistochemie bildet die Interaktion zwischen hochspezifischen mono- bzw. polyklonalen Antikörpern (Ak, IgG) mit dem nachzuweisenden Antigen (Ag). Ag besitzen spezielle Determinanten (Epitope), die von der F<sub>ab</sub>-Region des Ak (Abb. 16) erkannt werden und somit Antigen-Antikörper-Komplexe (Ag-Ak-Komplexe) bilden. Auf diese Weise können bei Anwesenheit von spezifischen Ak Ag jeglicher Art, wie zum Beispiel Proteine oder Peptide, in Geweben detektiert werden. Der Nachweis dieser Ag-Ak-Komplexe kann durch verschiedene Methoden, wie zum Beispiel durch die Avidin-Biotin-Methode (Hsu et al. 1981) mit anschließender Diaminobenzidin-Färbung oder durch indirekte Immunfluoreszenz (Coons 1958), erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Methoden eingesetzt, um die Gehirnpräparate immunhistochemisch nach unterschiedlichen Gesichtspunkten auswerten zu können.

#### ***2.8.1.1. Avidin-Biotin-Methode***

Die Avidin-Biotin-Methode basiert auf dem Einsatz eines biotinylierten Sekundär-Ak, der sich einerseits an den Primär-Ak anlagert und andererseits an seinen biotinylierten Stellen mit an Avidin gekoppelten Enzymen (z.B. Meerettich-Peroxidase) abgesättigt werden kann.

Avidin zeigt eine hohe Affinität gegenüber dem Biotin und vermittelt dadurch die Bindung einer Art „Enzymwolke“ am Ag-Ak-Komplex. Der Einsatz eines Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (Abb. 17) beinhaltet eine Signal-Amplifizierung.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird an den Ag-spezifischen Primär-Ak ein sekundärer, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Ak angelagert, der gegen die  $F_c$ -Region des Primär-Ak (Abb. 16) gerichtet ist. Dieser Ag-Ak-Komplex wird durch Anregung des Fluorophors mit seiner entsprechenden Wellenlänge sichtbar gemacht, indem es durch Filterung zur Emission der längerwelligen Strahlung kommt. Durch Verwendung von unterschiedlichen Primär-Ak aus unterschiedlichen Tierspezies und geeigneten Sekundär-Ak mit unterschiedlichen Fluorophoren kann mit der indirekten Immunfluoreszenz eine gleichzeitige Detektion mehrerer Ag erfolgen. Durch den zusätzlichen Einsatz eines biotinylierten Sekundär-Ak im Rahmen der indirekten Immunfluoreszenz ist ebenso eine Amplifizierung möglich.



**Abb. 16**

**Darstellung der Ag-Ak-Reaktion und der Bindung eines biotinylierten Sekundär-Ak.**  
 $F_{ab}$  = Ag-bindendes Fragment;  $F_c$  = kristallisierbares Fragment.

### 2.8.2. Verwendete Antikörper

| <b>Marker</b>  | <b>Bezeichnung/<br/>Spezifität</b>                               | <b>Hersteller/<br/>Konzentration</b>  |
|--|--|---|
| anti-STAT3 sc-482<br>(polyklonal,<br>made in rabbit) | „signal transducer and<br>activator of transcription 3“<br>STAT3 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., D-Heidelberg<br>1:12000 („free-floating“)<br>1:4000 („Fluoreszenz“) |
| anti-STAT5 sc-835<br>(polyklonal,<br>made in rabbit) | „signal transducer and<br>activator of transcription 5“<br>STAT5 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., D-Heidelberg<br>1:10000 („free-floating“)<br>1:1000 („Fluoreszenz“) |
| anti-NeuN<br>(monoklonal,<br>made in mouse)          | Neuronen-spezifisches<br>Kernprotein<br>neuronale Zellen         | MoBiTec GmbH, D-Göttingen<br>1:200  |
| anti-vW<br>(polyklonal,<br>made in sheep)            | von-Willebrand-Faktor<br>Endothelzellen                          | Haemochrom Diagnostica GmbH, D-Essen<br>1:3000  |
| anti-GFAP<br>(monoklonal,<br>made in mouse)          | saures gliales Faserprotein<br>Astrozyten                        | MoBiTec GmbH, D-Göttingen<br>1:2000   |

**Tab. 5**

Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Primär-Ak.

| <b>Substanzen/<br/>Sekundär-Ak<br/>(gerichtet gegen)</b>           | <b>gekoppeltes<br/>Fluorochrom</b> | <b>Hersteller/<br/>Konzentration</b>                                 |
|--|------------------------------------|--|
| goat anti-rabbit<br>biotinyliert<br>(anti-STAT3 und<br>anti-STAT5) | kein gekoppeltes Fluorochrom       | Vector Laboratories, Inc.,<br>USA-Burlingame<br>1:200                |
| goat anti-mouse<br>(anti-NeuN/-GFAP)                               | Alexa Fluor® 488                   | Molecular Probes, USA-Oregon<br>1:500                                |
| mouse anti-sheep<br>(anti-vW)                                      | FITC<br>Fluorescein-Isothiocyanate | Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.<br>USA-West Grove<br>1:250 |
| Streptavidin<br>(Biotin des anti-<br>rabbit-Antikörpers)           | Cy <sup>TM</sup> 3<br>Carbocyanin  | Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.<br>USA-West Grove<br>1:600 |

**Tab. 6**

Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Sekundär-Ak bzw. Substanzen, deren gekoppelte Fluorochrome, sowie deren Hersteller und Verdünnungen.

#### 2.8.2.1. Der anti-STAT3-Antikörper

Dieser Ak wurde zum Nachweis von zytoplasmatischen und/oder nukleären STAT3-Signalen in den Gewebeschnitten verwendet. Der anti-STAT3-Ak (Tab. 5) ist ein polyklonaler, im Kaninchen hergestellter Ak (sc-482, Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg), der am Carboxy-terminalen Ende des STAT3-Proteins eine Peptidsequenz (AS 750-769) erkennt. So wurden sowohl zytoplasmatisch vorkommende als auch nukleäre Moleküle des

Transkriptionsfaktors detektiert. STAT3-Monomere sind Moleküle, die in einer inaktiven, unphosphorylierten Form vorliegen. Die STAT3-Dimere hingegen entstehen durch Phosphorylierung der Monomere. Diese Dimere sind nun in der Lage, die Kernmembran zu penetrieren (nukleäre STAT3-Translokation) und eine Transkription an Zielgenen auszulösen (1.6.2.1.).

#### ***2.8.2.2. Der anti-STAT5-Antikörper***

Der in der Immunhistochemie verwendete anti-STAT5-Ak (Tab. 5) war ein im Kaninchen hergestellter, polyklonaler anti-STAT5b-Ak (sc-835, C-17, Santa Cruz Biotechnology, D-Heidelberg) und wurde zum Nachweis zytoplasmatischer und/oder nukleärer STAT5-Immunreaktivität in den Gewebeschnitten verwendet. Er erkennt sowohl die phosphorylierte (Dimere) als auch die unphosphorylierte Form (Monomere) des STAT5a- bzw. des STAT5b-Moleküls an den Aminosäuren 706-722 des Carboxy-terminalen Endes. Es besteht keine Kreuzreaktivität mit anderen STAT-Faktoren. STAT5-Monomere sind Moleküle, die in einer inaktiven, unphosphorylierten Form vorliegen. Die STAT5-Dimere hingegen entstehen durch Phosphorylierung der Monomere. Diese Dimere sind nun in der Lage, die Kernmembran zu penetrieren (nukleäre STAT5-Translokation) und eine Transkription an Zielgenen auszulösen (1.6.2.1.).



### 2.8.3. Immunhistochemische Protokolle

#### 2.8.3.1. Verwendete Substanzen und Lösungen

Die in Tab. 7 aufgeführten Substanzen und Lösungen wurden zur immunhistochemischen Analyse der Gehirnprouben verwendet.

| Bezeichnung                           | Substanz  | Hersteller                                      |
|---------------------------------------|---|---|
| NHS                                   | „normal-horse-serum“, hitzeinaktiviert                    | Commonwealth Serum Laboratories, Australia      |
| Triton-X-100                          | t-Octyl-phenoxy-polyethoxy-ethanol                        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim          |
| „NHS-blocking-solution“               | 10% NHS und 0,3% Triton-X-100 gelöst in PBS               | eigene Herstellung                              |
| „tyramin-blocking-solution“           | Testkit, NEL 700  | NEN <sup>TM</sup> Life Science Products, D-Köln |
| Streptavidin-HRP                      | „streptavidin horseradish complex“, Meerettich-Peroxidase | Vector Laboratories, Inc., USA-Burlingame       |
| „biotinyl-tyramide-reagent“           | Testkit, NEL 700  | NEN <sup>TM</sup> Life Science Products, D-Köln |
| ABC-Komplex                           | Vectastain-Elite-ABC-Kit-Standard                         | Linaris GmbH, D-Wertheim                        |
| DAB                                   | 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid                     | Sigma-Aldrich, D-Steinheim                      |
| 10%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid  | Merck, D-Darmstadt                              |
| Kresylviolett                         | 0,1% Cresylviolettacetat und 0,25% Eisessig               | Sigma-Aldrich, D-Steinheim                      |
| „Avidin/Biotin-blocking-solution“     | „Avidin/Biotin-blocking-Kit“                              | Vector Laboratories, Inc., USA-Burlingame       |
| DAPI                                  | 4',6-Diamidino-2-Diphenyl-Indoldilaktat                   | MoBiTec GmbH, D-Göttingen                       |

**Tab. 7**

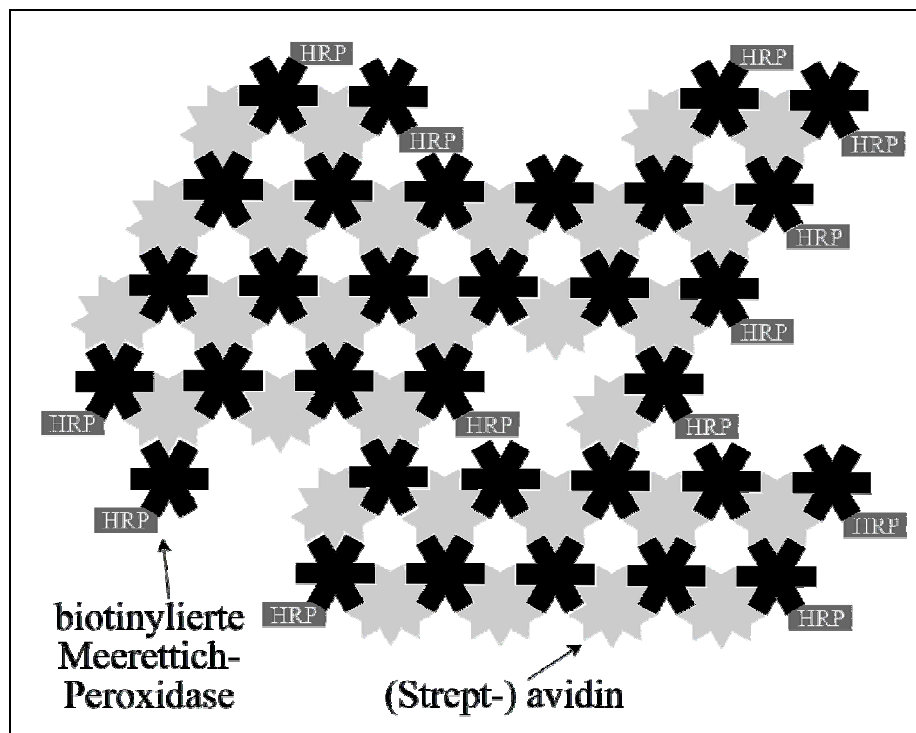
**Übersicht über die in den immunhistochemischen Protokollen verwendeten Substanzen und Lösungen sowie ihre Bezeichnung und Hersteller.**

#### 2.8.3.2. „Free-floating-Methode“

Die Immunhistochemie wurde mit zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Die „free-floating-Methode“ (Hübschle et al. 2001, Harré et al. 2002, Harré et al. 2003, Rummel et al. 2005) wurde zunächst angewandt, um die Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation nach zentraler Applikation im Rattengehirn in Form einer Einzelmarkierung nachzuweisen.

Dazu wurden die in den Sektoren gesammelten 40µm dicken Gehirnschnitte am selben Tag drei mal für 5min in 100ml PB gewaschen und anschließend 1h in „NHS-blocking-solution“ (Tab. 7) zum Abblocken der unspezifischen Ak-Bindungsstellen bei Raumtemperatur inkubiert. Hierzu wurden 100ml Blockungslösung (10ml „normal horse serum“, 300µl Triton X-100 auf 100ml PB, Tab. 7) pro Karusell angesetzt. Direkt im Anschluss wurde mit der Inkubation des Primär-Ak begonnen. Für diesen Schritt wurde der Ak 1:10000 (anti-STAT5, Tab. 5) in PB mit 2% NHS und 0,1% Triton X-100 verdünnt. Die Schnitte jeden Sektors wurden in je 1ml der Lösung in 5ml-Probengefäßen über 36-48h bei +4°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Pinsel in die jeweiligen Sektoren der Karusells, welche mit 100ml PB gefüllt waren, überführt und drei mal für 5min gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundär-Ak (biotinylierter anti-rabbit-Ak, Tab. 6) vorgenommen wurde. Dieser Sekundär-Ak wurde in PB, 2% NHS und 0,1% Triton X-100 1:200 verdünnt. Die Inkubation fand in 5ml-Probengefäßen für 1h bei Raumtemperatur statt. Nach der Inkubation wurden die Schnitte in die Karusells überführt und erneut gewaschen. Nun folgte die Inkubation mit dem ABC-Komplex (Linaris GmbH, D-Wertheim, Tab. 7). Die gebrauchsfertigen Bestandteile dieses Elite-Kits wurden eine halbe Stunde vor der eigentlichen Inkubation angesetzt. Hierzu wurden der Bestandteil „A“ (Avidin) und der Bestandteil „B“ (biotinylierte Meerettich-Peroxidase, HRP) jeweils mit einer Verdünnung von 1:100 in PB zusammengefügt, wodurch sich Avidin und die Meerettich-Peroxidase zu einem Komplex „C“ verbunden hatten (Abb. 17). Dann folgte die Inkubation der Schnitte über 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln, in welcher der Avidin-Meerettich-Peroxidase-Komplex an die freien Biotin-Bindungsstellen des Sekundär-Ak (Abb. 16) binden konnte. Nach der einstündigen Inkubation in der ABC-Komplex-Lösung wurden die Schnitte in die Karusells überführt und erneut drei mal für 5min gewaschen, bevor die Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-(DAB)-Reaktion (Sigma-Aldrich, D-Steinheim, Tab. 7) durchgeführt wurde. Für diese Reaktion war die HRP als enzymatischer Katalysator nötig, denn bei ihrer Anwesenheit konnte die Umsetzung von DAB aus seiner löslichen (violett) in seine feste Form (braun) stattfinden, allerdings nur im Bereich der HRP-Enzymwolke (Abb. 17), das heißt in unmittelbarer Nähe des Ag-Ak-Komplexes. Zur DAB-Reaktion wurde eine gefilterte DAB-Stocklösung (50mg/ml) mit 100ml PB verdünnt und die Schnitte in den Karusells für 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln vorinkubiert. Nach Ablauf dieser 15min wurde die Reaktion mit Hilfe von 10µl 10%igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Tab. 7) gestartet und die Karusells unter Sichtkontrolle ständig geschwenkt, bis die Schnitte eine kräftige Braunfärbung erreicht hatten. Durch Überführung der Karusells in PB wurde die Reaktion

gestoppt und die Schnitte ein letztes Mal gewaschen, bevor sie auf Gelatine beschichtete Objektträger (0,5% Gelatine, 0,05% Chromalaun, Chrom-III-Kaliumsulfat-Dodecahydrat als Bakterienchutz, Merck, D-Darmstadt) aufgezogen und getrocknet werden konnten. Abschließend wurde noch eine Gegenfärbung mit Kresylviolett (0,1% Cresylviolettacetat, Sigma-Aldrich, D-Steinheim) und 0,25% Eisessig (Tab. 7) durchgeführt.



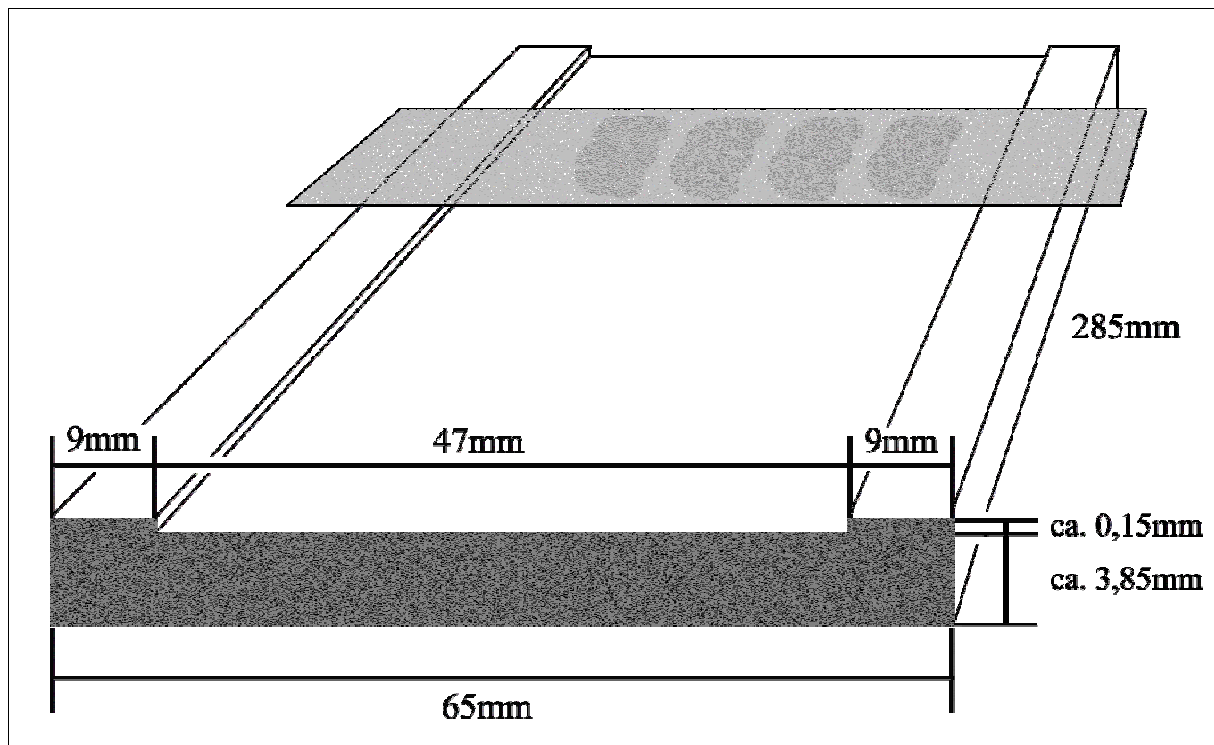
**Abb. 17**  
Darstellung der Komplexbildung zwischen (Strept-) Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (HRP).

Die Grundlage dieser Färbemethode beruht auf der Tatsache, dass Nervenzellen große Mengen an Nisslschollen (Stapel des rauen endoplasmatischen Retikulums) besitzen, die angefärbt werden können. Die Nisslfärbung ist eine Überfärbung eines in Alkohol fixierten Schnittes mit einem Tiazinfarbstoff (Kresylviolett). Durch das nachfolgende Auswaschen des Farbstoffüberschusses entfärben sich die Nervenfasern schneller als die Zellsomata. Auf diese Weise wird das Zellsoma gegenüber dem farblosen Hintergrund intensiver gefärbt.

Hierzu wurden die Objektträger für 2h in Histosol (HistoClear, W. Planet GmbH, D-Wetzlar) entfettet. Nach diesen 2h wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkohol-Reihe jeweils zwei mal für 2min zunächst in 100, dann in 90, 70 und zuletzt in 50%iger Ethanol-Lösung gereinigt und entwässert. Nach kurzem Abspülen des Ethanols in *Aqua dest.* wurden die Schnitte für ca. 20sec unter ständigem Schwenken in Kresylviolett gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe zunächst kurz in 50, dann in

90%igen und jeweils für 2min in 95, dann in 100%igen Ethanol getaucht. Nach einer zwei minütigen Inkubation in Histoclear und einer zwei bis drei minütigen Inkubation in Xylol (Braun, D-Melsungen) wurden die Schnitte mit Entellan® (Xylol-Isomerengemisch, Merck, D-Darmstadt) und Objektgläsern (Menzel GmbH, D-Braunschweig) eingedeckelt.

### 2.8.3.3. „Fluoreszenz-Methode“



**Abb. 18**  
Skizze der Inkubationsplatte mit aufliegendem Objektträger für die Inkubation der Gehirnschnitte in den Ak-Lösungen während der „Fluoreszenz-Methode“.

Die indirekte „Fluoreszenz-Methode“ (Hübschle et al. 2001, Harré et al. 2003, Rummel et al. 2005) wurde angewandt, um in einer immunhistochemischen Dreifachmarkierung einerseits einen Nachweis über die nukleären oder zytoplasmatischen STAT3- bzw. STAT5-Signale zu führen und um andererseits einen neuronalen, endothelialen oder astrozytären Ursprung dieser Signale zu untersuchen.

Die über Nacht im Kühlschrank aufbewahrten und getrockneten Gehirnschnitte wurden zunächst in PB über 15min rehydriert, für 10min bei Raumtemperatur in 2%iger PFA-Lösung (2.4.) nachfixiert und im Anschluss drei mal für 5min in PB gewaschen. Zum Abblocken der unspezifischen Ak-Bindungsstellen wurden die Schnitte für 60min bei Raumtemperatur in 10%iger „NHS-blocking-solution“ (Tab. 7) inkubiert. Das weitere Protokoll richtete sich nach

der Verwendung des jeweiligen zweiten Primär-Ak (anti-NeuN, anti-vW (von Willebrand-Faktor) oder anti-GFAP (saures gliales Faserprotein), Tab. 5).

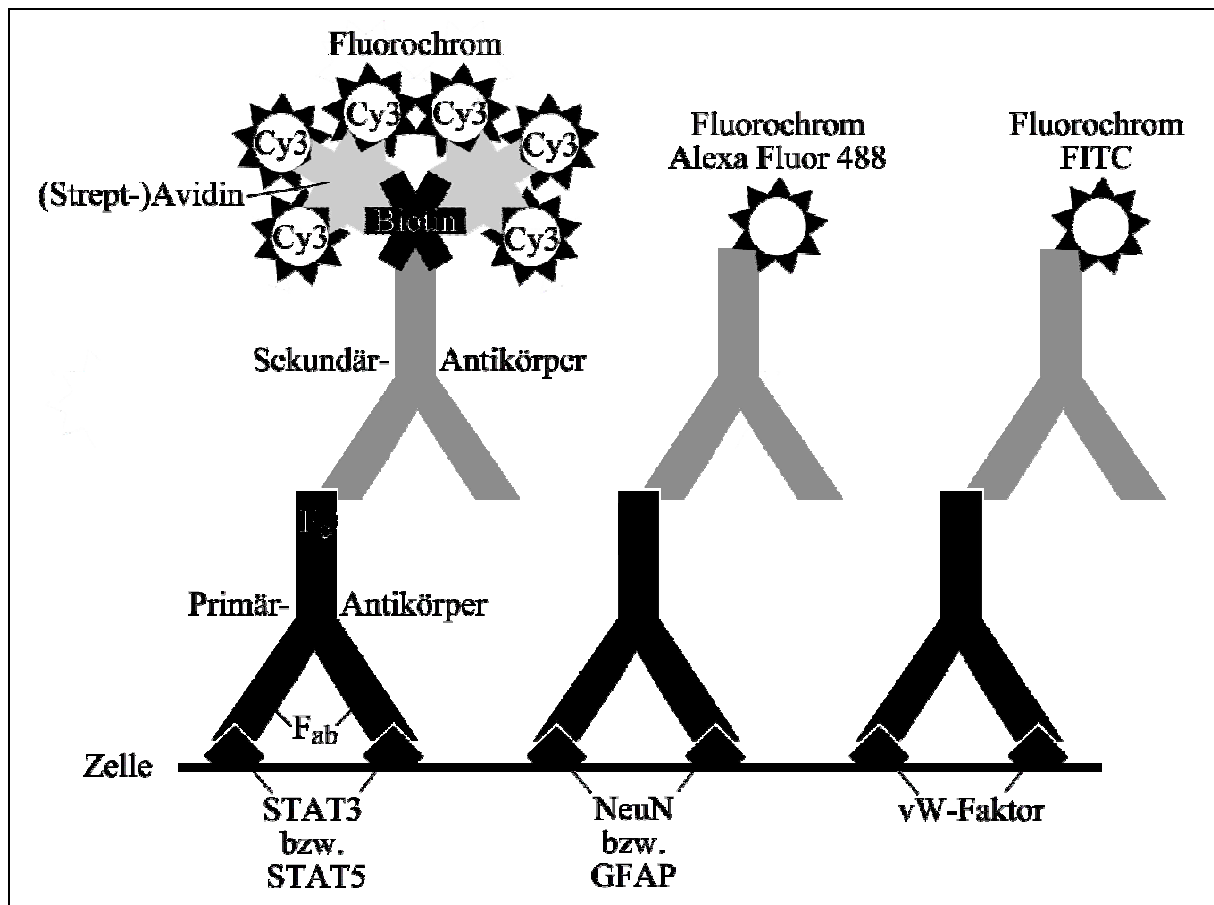


Abb. 19

Darstellung der Doppelmarkierung bei der „Fluoreszenz-Methode“. Rechts: Detektion der STAT3- bzw. STAT5-Moleküle mit seinem Primär-Ak (anti-STAT3 bzw. anti-STAT5), seinem Sekundär-Ak (anti-rabbit, biotinyliert) und dem Cy3-gekoppelten Streptavidin. Mitte: Markierung der NeuN-Moleküle mittels des Primär-Ak (anti-NeuN) und seinem direkt Fluorochrom-(Alexa Fluor 488)-gekoppelten Sekundär-Ak. Links: Detektion des vW-Faktors durch seinen Primär-Ak (anti-vW) und seinem direkt Fluorochrom-(FITC)-gekoppelten Sekundär-Ak.

Zur Inkubation mit den Ak-Lösungen wurden jeweils zehn von den mit Schnitten behafteten Objektträgern (2.7.2.) mit den Schnitten nach unten weisend auf die dafür speziell angefertigten Inkubationsplatten (institutseigene Herstellung aus transparentem Polycarbonat, Abb. 18) angeordnet und in geschlossene, befeuchtete Blechkammern, welche insgesamt acht der Inkubationsplatten fassten, gelegt. Die Ak-Lösung wurde dabei zwischen die Objektträger auf den 47mm breiten Bereich der Inkubationsplatten pipettiert, wozu pro Platte ca. 2ml Ak-Lösung benötigt wurden. Zwischen den einzelnen Inkubationsplatten, die in den Blechkammern übereinander angeordnet wurden, wurden Abstandshalter eingelegt. Diese dienten dazu, einen direkten Kontakt der Platten untereinander zu vermeiden. Zu jedem

Waschschritt wurden die Inkubationsplatten aus der Blechkammer genommen und die Objektträger mit den Gehirnschnitten wieder in die Objektträgerhalter eingeordnet. Die Inkubationsplatten wurden vor jedem Inkubationsschritt unter fließendem *Aqua dest.* gereinigt und getrocknet, um jeweils eine Verschleppung der Inkubationslösungen in die darauffolgenden Inkubationsschritte zu vermeiden.

#### **2.8.3.3.1. Weiterführendes Protokoll mit dem neuronalen Marker (NeuN)**

Nach dem Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen und dem darauffolgenden Waschschritt erfolgte eine Ko-Inkubation beider Primär-Ak (anti-STAT3, bzw. anti-STAT5 und anti-NeuN, alle Tab. 5) bei +4°C über zwei Nächte auf den Inkubationsplatten in der befeuchteten Blechkammer (2.8.3.3.). Hierzu wurden die Primär-Ak anti-STAT3 1:1000, bzw. anti-STAT5 1:4000 und anti-NeuN 1:200 in 2% NHS, 0,1% Triton-X-100 (Tab. 7) und der entsprechenden Menge an PB gelöst. Zwei Tage später wurden die Schnitte gewaschen und die unspezifischen Avidin- und Biotin-Bindungsstellen mittels eines „Avidin/Biotin-blocking-Kit“ (Tab. 7) abgeblockt. Zunächst fand eine Inkubation mit der Avidin-Lösung (50µl/ml PB) auf den Inkubationsplatten in der Blechkammer bei Raumtemperatur im Dunkeln über 15min statt. Daraufhin folgte nach einem Waschschritt die Inkubation mit der Biotin-Lösung (ebenfalls 50µl/ml PB) unter den gleichen Bedingungen. Bevor die Inkubation mit den Sekundär-Ak (Tab. 6) vorgenommen werden konnte, mussten die Schnitte drei mal für 5min gewaschen werden. Zur Detektion der Primär-Ak anti-STAT3 bzw. anti-STAT5 wurde ein biotinylierter anti-rabbit-Ak in einer Verdünnung von 1:200 und zur Detektion des Primär-Ak anti-NeuN ein direkt Alexa Fluor 488-gekoppelter anti-mouse-Ak in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt (Abb. 19). Diese Sekundär-Ak wurden in 2% NHS, 0,3% Triton-X-100 und einer entsprechenden Menge an PB gelöst. Die Inkubation fand in den Blechkammern bei Raumtemperatur im Dunkeln über 90min statt. Nach einem Waschschritt fand die endgültige Detektion von STAT-Molekülen mittels Cy<sup>TM</sup>3-gekoppeltem Streptavidin (Tab. 6) mit einer Verdünnung von 1:600 statt. Inkubiert wurde ebenfalls in der Blechkammer bei Raumtemperatur für 60min im Dunkeln, woraufhin nochmals drei mal für 5min gewaschen wurde. Die anschließende DAPI-Kernfärbung (Tab. 7) war wieder für alle Protokolle gleich. Diese fand in geschlossenen, schwarzen Färbeküvetten, in welche die Objektträgerhalter gestellt wurden, statt. Hierzu wurde eine Stocklösung, die in Aliquots bei –20°C eingefroren war, 1:1000 mit PB und 0,1% Triton-X-100 verdünnt und für 10min unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. DAPI ist ein unspezifischer Marker, der alle Zellkerne detektiert, indem er mit der doppelsträngigen DNA (Desoxyribonucleinsäure)

interagiert. Nach einem letzten Waschschrift konnten die Objektträger blasenfrei mit Citifluor (Citifluor Produkts, GB-Kent) und Objektgläsern (Menzel GmbH, D-Braunschweig) gedeckelt werden.

#### **2.8.3.3.2. Weiterführendes Protokoll mit dem endothelialen Marker (vW)**

Nach dem Abblocken der unspezifischen Ak-Bindungsstellen mit der „NHS-blocking-solution“ (Tab. 7) folgte in diesem Fall nur eine Einzel-Inkubation des Primär-Ak. Inkubiert wurde mit dem anti-STAT3-Ak in einer Verdünnung von 1:1000 bzw. anti-STAT5-Ak in einer Verdünnung von 1:4000 (beide Tab. 5), der in PB mit 2% NHS, 0,3% Triton-X-100 gelöst wurde. Nachdem die Inkubation in der Blechkammer bei +4°C über zwei Nächte stattgefunden hatte, erfolgte auch hier nach einem vorgeschalteten Waschschrift die Abblockung der unspezifischen Avidin- und Biotin-Bindungsstellen mit dem „Avidin/Biotin-blocking-Kit“ (Tab. 7), wie auch schon in 2.8.3.3.1. beschrieben wurde. Bevor mit der nun folgenden Inkubation begonnen werden konnte, musste wieder drei mal für 5min gewaschen werden. Dann fand eine Ko-Inkubation mit dem Primär-Ak anti-vW (Tab. 5) in einer Verdünnung von 1:3000 und dem biotinylierten Sekundär-Ak anti-rabbit (Tab. 6) in einer Verdünnung von 1:200 in PB mit einem Zusatz von 2% NHS und 0,3% Triton-X-100 bei Raumtemperatur in der Blechkammer für 90min im Dunkeln statt. Es folgte ein Waschschrift. Zur endgültigen Detektion der STAT-Moleküle und des vW-Faktors (Abb. 19) wurde eine weitere Ko-Inkubation für 90min in der Blechkammer bei Raumtemperatur im Dunkeln vorgenommen. Diesmal wurde das Cy<sup>TM</sup>3-gekoppelte Streptavidin zur endgültigen Detektion der STAT-Moleküle in einer Verdünnung von 1:600 mit einem direkt FITC-gekoppelten anti-sheep-Ak (Tab. 6) in einer Verdünnung von 1:250 kombiniert. Verdünnt wurde in PB, welches mit 2% NHS und 0,3% Triton-X-100 versetzt war. Daraufhin folgte wieder ein Waschschrift und die in 2.8.3.3.1. beschriebene DAPI-Kernfärbung sowie das Eindeckeln mit Citifluor.

#### **2.8.3.3.3. Weiterführendes Protokoll mit dem Astrozyten-Marker (GFAP)**

Hier fand wieder eine Ko-Inkubation beider Primär-Ak nach dem Abblocken der unspezifischen Ak-Bindungsstellen statt. Der anti-STAT3- bzw. anti-STAT5-Ak (Tab. 5) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 bzw. 1:4000 und der anti-GFAP-Ak (Tab. 5) in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die Schnitte wurden über zwei Nächte bei +4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit folgte ein Waschschrift in PB und eine

Abblockung der unspezifischen Avidin- und Biotin-Bindungsstellen mit dem „Avidin/Biotin-blocking-Kit“ (Tab. 7) unter den gleichen Bedingungen wie schon im 2.8.3.3.1. beschrieben wurde. Bevor nun die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundär-Ak anti-rabbit (Tab. 6) in einer Verdünnung von 1:200, gelöst in PB mit 2% NHS und 0,3% Triton-X-100, zur Detektion der Primär-Ak anti-STAT3 bzw. anti-STAT5 stattfand (Abb. 19), mussten die Schnitte erneut drei mal für 5min in PB gewaschen werden. Die Inkubation dauerte 90min im Dunkeln bei Raumtemperatur, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Anschließend wurden die STAT- und GFAP-Moleküle endgültig durch eine Ko-Inkubation mit Cy<sup>TM</sup>3-gekoppeltem Streptavidin in einer Verdünnung von 1:600 und direkt Alexa Fluor 488-gekoppeltem anti-mouse-Ak mit einer Verdünnung von 1:500 (beide Tab. 6), gelöst in PB, detektiert. Daraufhin folgte wieder ein Waschschrift und die schon in 2.8.3.3.1. beschriebene DAPI-Kernfärbung sowie das Eindeckeln mit Citifluor.

## **2.9. Analyse der Blutproben**

Die Blutproben, die direkt vor der Perfusion aus dem linken Ventrikel des Herzens entnommen wurden, wurden auf ihre Plasma-Leptin- und -IL-6-Werte sowie auf Konzentrationen von Tumor-Nekrose-Faktor-ähnlichen Zytokinen (TNF, 2.9.3.) überprüft. Die Bestimmung wurde ausschließlich bei den i.p.-stimulierten Tieren durchgeführt. Da bei den i.c.v.-stimulierten Tieren nur eine sehr geringe Menge an Leptin (3,5µl/Tier) zentral appliziert wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Plasma-Konzentrationen von zirkulierendem IL-6 und TNF nicht beeinflusst wurden.

### ***2.9.1. Der Leptin-Radioimmunoassay (RIA)***

Die Bestimmung der Plasma-Leptinwerte in den Blutproben der Ratten diente dem Nachweis der ausreichenden Resorption von Leptin nach der i.p.-Stimulation (2.5.1.2.). Denn nur dies gewährleistete, dass das i.p.-applizierte Leptin wirklich in der Lage war, das ZNS zu erreichen und dort eine STAT3- bzw. STAT5-Aktivierung herbeiführen zu können.

#### ***2.9.1.1. Prinzip des Leptin-Radioimmunoassays***

Diese Methode ermöglicht die quantitative Bestimmung der biologisch aktiven sowie inaktiven Form des Hormons „Leptin“ im Blutplasma. Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung basiert auf einer Ag-Ak-Reaktion, wobei Leptin als Ag und



spezifische  $\gamma$ -Immunglobuline als Ak gegen Leptin fungieren. Dazu erfolgt eine zeitversetzte Inkubation der zuvor gebildeten Ag-Ak-Komplexe mit identischem, jedoch radioaktiv markiertem Leptin (Tracer) bekannter Konzentration. Die Konzentration des Radioliganden und des hormonspezifischen Ak wird unter Berücksichtigung der höchstmöglichen Empfindlichkeit des RIAs festgelegt. In dieser zweiten Inkubationsphase kommt es zu einer kompetitiven Verdrängungsreaktion, wobei radioaktiv markiertes und unmarkiertes Leptin um die gleichen Bindungsstellen der Ak konkurrieren. Je höher die Konzentration an unmarkiertem Ag ist, desto geringer ist auch die Radioliganden-Bindung. Um die zu messende Radioaktivität des eingesetzten Tracers zu bewerten wird zwischen der gesamten Aktivität (TO), der nicht-spezifisch gebundenen Aktivität (NSB) und der sich aus der Differenz (TO – NSB) ergebenden, spezifischen Bindung des zu bestimmenden Leptins am Ak unterschieden. Die NSB beinhaltet Bindungen z.B. an Plasmaproteine, an zugesetzten Reagenzien oder an Arbeitsmaterialien. Voraussetzung für die Quantifizierung der jeweiligen Leptin-Konzentrationen in den zu untersuchenden Plasmaextrakten ist die Erstellung einer Standardkurve. Hierzu wird eine konstante Ak- und Tracer-Konzentration verwendet. Beide sind so gewählt, dass bei Abwesenheit des unmarkierten Leptins etwa 50% des radioaktiv markierten Leptins an die Ak binden können ( $B_0$ -Wert). Steigende Konzentrationen an zugesetztem unmarkiertem Leptin führen zu einer dosisabhängigen Abnahme der Radioliganden-Bindung an den spezifischen Ak-Bindungsstellen und damit zu einer abnehmenden Radioaktivität im Ansatz. Anhand der erstellten, semilogarithmischen Eichkurve (Abb. 20) kann dann die unbekannte Leptin-Konzentration in den Plasmaproben bestimmt werden.

### ***2.9.1.2. Durchführung des Leptin-Radioimmunoassays***

Die Bestimmung der Plasma-Leptin-Konzentration wurde durch eine Kooperation mit dem „Rowett Research Institute, Division of Energy Balance and Obesity“ in Aberdeen, Schottland durchgeführt. Das Protokoll für die Plasma-Leptin-Bestimmung wurde von den Mitarbeitern des Instituts unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Rat-Leptin RIA-Kit, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln) abgearbeitet (Maffei et al. 1995). Der RIA-Kit besaß gegenüber Ratten- als auch Maus-Leptin eine Spezifität von 100% und zeigte keine Kreuzreaktivität mit Insulin und Glukagon.

### **2.9.2. Der Interleukin-6-(IL-6)-Bioassay**

Durch den IL-6-Bioassay wurde biologisch aktives IL-6 im Blutplasma nach der systemischen Leptin-Stimulation gemessen, um eine IL-6-vermittelte nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Translokation im Gehirn ausschließen zu können (1.6.2.1.).

#### **2.9.2.1. Prinzip des IL-6-Bioassays**

Das Prinzip des IL-6-Assays basiert auf dem proliferativen Einfluss von IL-6 auf die B9-Hybridoma-Zellen (Aarden et al. 1987) (2.9.2.2.). Das Zellwachstum ist spezifisch und Dosis-abhängig durch IL-6 vermittelt. Je höher die vorhandene IL-6 Aktivität, desto größer ist die dadurch beeinflusste Vermehrungsrate der B9-Zellen. Durch die Zugabe eines Farbstoffs (3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid, MTT, Tab. 8), welcher in den Mitochondrien lebender Zellen zu violetten Formazankristallen verstoffwechselt wird, kann die daraus resultierende optische Dichte nach anschließender Zelllyse und Auflösung der Kristalle mittels Isopropanol/HCL-Lösung (Tab. 8) photometrisch bestimmt werden. Durch den Einsatz von Verdünnungsreihen ergibt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die durch Verwendung internationaler Standardreihen quantifiziert werden kann und einen Vergleich zwischen verschiedenen Labors zulässt. Die Durchführung des Assays und die Passage der Zellen wurde unter sterilen Bedingungen einer Reinarbeitsbank (Microflow, Nunc Int., D-Wiesbaden-Biebrich) durchgeführt.

#### **2.9.2.2. Verwendete Zelllinie**

Die Quantifizierung der biologischen Aktivität von IL-6, die von Lansdorp und Kollegen (1986) durch die Injektion von Pristane (2,6,10,14-Tetramethylpentacane) in die Bauchhöhle von Balb/c-Mäusen entwickelt wurde (Lansdorp et al. 1986), wurde mit der IL-6-abhängigen B9-Hybridoma Zelllinie (Hybridoma Zelllinie B13.29) durchgeführt. Sie entstand durch die Fusion von Milzzellen, die von Lansdorps Balb/c-Mäusen entnommenen wurden, mit Hybrid-Plasmazytomzellen (Sp2/0Ag14). Deren Subklon ist die im Versuch verwendete B9-Zelllinie, die eine sehr hohe Sensitivität gegenüber IL-6 aufweist, so dass der Nachweis der biologischen Aktivität von IL-6, die von einem einzigen menschlichen Monozyten produziert wird, möglich ist (Aarden et al. 1987). Die Nachweisgrenze für diesen Assay lag bei 3 IU IL-6/ml (Ross et al. 2003). Die B9-Zellen wurden in einem spezifischen Kulturmedium kultiviert, das aus unterschiedlichen Substanzen hergestellt wurde (Tab. 8).

| Bezeichnung  | Zusammensetzung   | Hersteller  |
|--|---|---|
| Kultur- bzw. Assaymedium   | 45ml RPMI Medium<br>4,0ml fetales Kälberserum<br>0,5ml Glutamin (200nM)<br>125µl Mercaptoethanol (200mmol/l)<br>65µl Gentamicin | Life Technologies, Schottland-Paisley   |
| Wachstums-Medium   | Assaymedium zuzüglich 500µl <i>hrIL-6</i> (50 IU/ml)  | Life Technologies, Schottland-Paisley und NIBSC, UK-Potters Bar                 |
| IL-6-Standard  | 500µl <i>hrIL-6</i> (50 IU/ml)  | National Institute for biological Standards and Control (NIBSC), UK-Potters Bar |
| Qualitätskontrolle I (QK-I)  | 500µl <i>hrIL6</i> (10 IU/ml)   | NIBSC, UK-Potters Bar   |
| Qualitätskontrolle II (QK-II)                                      | 500µl <i>hrIL-6</i> (30 IU/ml)  | NIBSC, UK-Potters Bar   |
| MTT<br>3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) | 0,1g MTT<br>aufgelöst in 20ml PBS   | Sigma Chemicals, USA-St.Louis, MO   |
| Isopropanol/HCl-Lsg. (0,04M)                                       | 4ml 2N HCl<br>196ml Isopropanol   | Merck, D-Darmstadt  |

**Tab. 8**

**Auflistung der im IL-6-Bioassay benötigten Substanzen, ihre Zusammensetzung sowie deren Hersteller.**

Dazu gehörten das „Rothwell Park Memorial Institute Medium“ (RPMI 1640), Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS), Gln, Mercaptoethanol und Gentamicin. Dieses Kulturmedium wurde ebenso als Assaymedium verwendet. Die Zugabe von humanem-rekombinantem IL-6 (*hrIL-6*, Tab. 8, „National Institute for biological Standards and Control“, Potters Bar, UK) machte es möglich, dieses Kulturmedium gleichzeitig als Wachstumsmedium verwenden zu können. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank (Queue™, Nunc Int., D-Wiesbaden-Biebrich) bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchte von 95%, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und 95% Raumluft. Spätestens nach jedem dritten Tag mussten die Zellen in ein neues Wachstumsmedium passagiert werden. Dazu wurden 9ml von dem neuen Wachstumsmedium in eine neue 50ml Kulturflasche (Greiner GmbH, D-Frickenhausen) vorgelegt und 1ml der Zellsuspension aus der alten Kulturflasche hinzupipettiert.

### 2.9.2.3. Vorbereitung der Zellen für den IL-6-Bioassay

Die Vorbereitung diente dazu, die Zellen von dem im Wachstumsmedium zugesetzten *hrIL-6* zu befreien, um nicht die IL-6-Werte der Plasmaproben zu verfälschen. Die Zellsuspension aus der zuvor angelegten Kultur (2.9.2.2.) wurde für 10min bei 2300 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die desuspendierten Zellen anschließend mit ca. 9ml Assaymedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei mal durchgeführt, bis das gesamte *hrIL-6* aus den Zellen ausgewaschen war. Nach dem letzten Durchgang wurden 50µl dieser Suspension in einer Zählkammer (Hämozytometer nach Thoma, Fa. Kretschmer, D-Gießen) ausgestrichen. Dies war nötig, da für den Assay eine Zellsuspension von etwa 50 Zellen/µl Medium erwünscht war. Hierzu wurden 80 Kleinstquatre ausgezählt und die Zellzahl notiert. Anhand dieser ausgezählten Zellen wurde mittels einer Formel (Verdünnungsfaktor (V) = Zellzahl/Kammerfaktor x ausgezählte Zellen (AZ), entspricht:  $V = 50/50 \times AZ$ ) der Verdünnungsfaktor ermittelt, um die gewünschte Konzentration einzustellen. Diese Suspension konnte dann im Assay verwendet werden.

#### Daten der Zählkammer:

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Tiefe:                           | 0,1mm   |
| Größe der Kleinstquatre:         | $0,05 \times 0,05\text{mm} = 0,0025\text{mm}^2$                       |
| Rauminhalt von 80 Kleinstquatre: | $80 \times (0,0025\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm}) = 0,02\text{mm}^3$ |
| Kammerfaktor:                    | $1\mu\text{l}/0,02\mu\text{l} = 50$                                   |

### 2.9.2.4. Durchführung des IL-6-Bioassays

Am ersten Tag wurden zunächst die Vorverdünnungen angefertigt, die sterilen Mikrotiterplatten (Cellstar®, Greiner, D-Frickshausen) beschriftet und beschickt (Tab. 9). Zunächst wurde in jede Vertiefung, außer in den Spalten A und B, 100µl des Assaymediums vorgelegt. Zusätzlich wurde in die Vertiefung B1 200µl IL-6-Standard (Tab. 8), was 50 IU/ml entsprach, in A2 & B2 sowie in A3 & B3 je 200µl der Qualitätskontrollen-(QK)-I und -II (Tab. 8) gefüllt und die Vertiefungen A4 bis A8 und B4 bis B8 mit 200µl der jeweiligen vorverdünnten Probe (1 Teil Plasma/20 Teile Medium) beschickt. Zur Erstellung der Standard-Verdünnungsreihe in Spalte 1 wurden 100µl aus B1 abpipettiert und mit dem Medium in C1 vermischt. Von diesem Gemisch wurden wiederum 100µl abpipettiert und in

D1 gegeben. Auf diese Weise wurde bis zur Vertiefung K1 fortgefahren, von welcher dann 100µl verworfen wurden. In L1 verblieb nur reines Assaymedium. Auf diese Weise erhielt man von Vertiefung zu Vertiefung eine jeweils um den Faktor zwei höhere Verdünnungsstufe. Ähnlich wurde mit der Verdünnungsreihe für die QK und die Plasmaproben verfahren. Der Unterschied lag lediglich in der Doppelbestimmung dieser Proben. Das heißt, dass jeweils 100µl aus A2 bis A8 abpipettiert und mit dem Medium in C2 bis C8 vermischt wurden, aus denen dann wiederum 100µl in E1 bis E8 überführt wurden. So wurde bis zur Spalte K fortgefahren, aus der schließlich 100µl verworfen wurden. Auf die gleiche Weise wurden die QK und die Proben aus Spalte B verdünnt, wobei diese in die Vertiefungen in Spalte D, F, H, J und L überführt wurden. Anschließend wurden 100µl, wie in 2.9.2.3. beschrieben, der vorbereiteten Zellsuspension mit der Zelllinie B9-Hybridoma (2.9.2.2.) in alle Vertiefungen außer A1 einpipettiert. Am vierten Tag, nach einer 72 stündigen Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank, wurden in jede Vertiefung, außer A1, 25µl des Farbstoffs MTT (Tab. 8) mit einer Konzentration von 5mg/ml einpipettiert, woraufhin wieder für 4h im Brutschrank inkubiert werden musste. Während dieser Inkubationszeit wurde der gelbe Farbstoff MTT in den Mitochondrien durch Succinyl-Dehydrogenasen der Zellen zu dunkelblauen Formazankristallen verstoffwechselt und bildete somit die Grundlage für die photometrische Bestimmung der Zellaktivität (siehe auch 2.9.2.1.).

|   | A      | B        | C            | D              | E              | F              | G               | H               | I               | J                | K               | L          |
|---|--------|----------|--------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------|
| 1 | Blank  | Standard | 1:1<br>25 IU | 1:2<br>12,5 IU | 1:4<br>6,25 IU | 1:8<br>3,13 IU | 1:16<br>1,56 IU | 1:32<br>0,78 IU | 1:64<br>0,39 IU | 1:128<br>0,19 IU | 1:256<br>0,1 IU | Medium     |
| 2 | QK-I   | QK-I     | 1:1<br>A2    | 1:1<br>B2      | 1:2<br>C2      | 1:2<br>D2      | 1:4<br>E2       | 1:4<br>F2       | 1:8<br>G2       | 1:8<br>H2        | 1:16<br>I2      | 1:16<br>J2 |
| 3 | QK-II  | QK-II    | 1:1<br>A3    | 1:1<br>B3      | 1:2<br>C3      | 1:2<br>D3      | 1:4<br>E3       | 1:4<br>F3       | 1:8<br>G3       | 1:8<br>H3        | 1:16<br>I3      | 1:16<br>J3 |
| 4 | Proben | Proben   | 1:1<br>A4    | 1:1<br>B4      | 1:2<br>C4      | 1:2<br>D4      | 1:4<br>E4       | 1:4<br>F4       | 1:8<br>G4       | 1:8<br>H4        | 1:16<br>I4      | 1:16<br>J4 |
| 5 | Proben | Proben   | 1:1<br>A5    | 1:1<br>B5      | 1:2<br>C5      | 1:2<br>D5      | 1:4<br>E5       | 1:4<br>F5       | 1:8<br>G5       | 1:8<br>H5        | 1:16<br>I5      | 1:16<br>J5 |
| 6 | Proben | Proben   | 1:1<br>A6    | 1:1<br>B6      | 1:2<br>C6      | 1:2<br>D6      | 1:4<br>E6       | 1:4<br>F6       | 1:8<br>G6       | 1:8<br>H6        | 1:16<br>I6      | 1:16<br>J6 |
| 7 | Proben | Proben   | 1:1<br>A7    | 1:1<br>B7      | 1:2<br>C7      | 1:2<br>D7      | 1:4<br>E7       | 1:4<br>F7       | 1:8<br>G7       | 1:8<br>H7        | 1:16<br>I7      | 1:16<br>J7 |
| 8 | Proben | Proben   | 1:1<br>A8    | 1:1<br>B8      | 1:2<br>C8      | 1:2<br>D8      | 1:4<br>E8       | 1:4<br>F8       | 1:8<br>G8       | 1:8<br>H8        | 1:16<br>I8      | 1:16<br>J8 |

Tab. 9

Schema zum Beschicken einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Beschreibung im Text).

Nach diesem Schritt war kein steriles Arbeiten mehr nötig. Nun wurden aus jeder Vertiefung 125µl der über den Zellen befindlichen Flüssigkeit abpipettiert und allen außer A1 100µl

Isopropanol-HCL (Tab. 8) zugegeben und für weitere 10h im Brutschrank lichtgeschützt inkubiert. Durch diese Reaktion wurden die Zellwände und die Zellorganellen zerstört und die Formazankristalle freigegeben. Anschließend wurde mittels eines Photometers (ELISA-Reader, Digiscan, Asys Hitech., A-Eugendorf) die optische Dichte aller Vertiefungen der Platte bei einer Wellenlänge von 550nm bestimmt.

### ***2.9.3. Der Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Bioassay***

Durch den Bioassay wurden biologisch aktive TNF-ähnliche Zytokine im Blutplasma nach systemischer Leptin-Stimulation nachgewiesen um eine durch TNF vermittelte nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Translokation im Gehirn ausschließen zu können. Zu den TNF-ähnlichen Zytokinen gehören neben TNF $\alpha$  auch TNF $\beta$  und Lymphotoxin- $\beta$  (Browning et al. 1993). Diese werden im Rahmen dieser Arbeit vereinfacht als „TNF“ bezeichnet.

#### ***2.9.3.1. Prinzip des TNF-Bioassays***

Das Prinzip des Assays basiert auf dem zytotoxischen Effekt von TNF auf bestimmte Zelltypen (z.B. WEHI-Zelllinie, 2.9.3.2.). Durch eventuell vorkommendes TNF in den Plasmaproben kommt es zu einem dosisabhängigen Absterben der Zellen im Testansatz. Nach Zugabe des Farbstoffes MTT (Tab. 10), der in den Mitochondrien noch lebender Zellen zu violetten Formazankristallen umgewandelt wird, kann die optische Dichte nach einer induzierten Zelllyse und Kristallauflösung mittels der Isopropanol/HCl-Lösung (Tab. 10) in einem Photometer bestimmt werden. Aus verschiedenen Verdünnungsreihen ergibt sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die durch Verwendung internationaler Standardreihen quantifiziert werden kann und einen Vergleich zwischen verschiedenen Labors zulässt (Meager and Das 1994). Alle Arbeiten, d.h. die Passage der Zellen und die Durchführung der Assays, wurden unter sterilen Bedingungen einer Reinarbeitsbank (Microflow, Nunc Int., D-Wiesbaden-Biebrich) durchgeführt.

#### ***2.9.3.2. Verwendete Zelllinie***

Die zur TNF-Bestimmung verwendete Zelllinie war eine murine Fibrosarkomzelllinie WEHI (Walter and Elizabeth Hall Institute) 164 Subklon 13 (Rollinghoff et al. 1973). Die Zelllinie wurde in der „American Tissue Culture Collection“ (ATCC) unter der Bezeichnung CRL 1751 geführt. Die Zellen stammten aus einem Fibrosarkom, das durch die subkutane Injektion

von Methylcholanthren in BALB/c Mäusen induziert wurde. Daraus wurde ein Subklon isoliert (Espevik and Nissen-Meyer 1986), der äußerst empfindlich gegenüber TNF reagierte. Diese Zelllinie war so spezifisch, dass weder Dexamethason noch Prostaglandin-E<sub>2</sub> in Konzentrationen bis 10<sup>-5</sup> mol/l den Assay beeinflussen konnten (Eskandari et al. 1990). Die Nachweisgrenze für diesen Assay lag bei 6pg TNF/ml (Ross et al. 2003). Diese speziellen Fibroblasten wurden in einem Kulturmedium, bestehend aus 500ml „Rothwell Park Memorial Institute Medium“ (RPMI 1640, Fa. Life Technologies, Paisley, Schottland) mit einem Zusatz von 55ml FCS, 5ml Gln (200nM) sowie 5ml Penicillin-Streptomycin (50000 IU/ml) (Tab. 10) kultiviert. Dies erfolgte in 250ml Kulturflaschen (Greiner GmbH, D-Frickenhausen) in einem Brutschrank (Queue™, Nunc Int., D-Wiesbaden-Biebrich) bei einer Temperatur von 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 95%, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und 95% Raumluft. Die spindelförmigen Fibroblasten hatten sich etwa nach drei Tagen zu ca. 80% an der Bodenfläche der Kulturflasche angeheftet. Die Passage in ein neues Kulturmedium, die unter sterilen Bedingungen einer Reinarbeitsbank (Microflow, Nunc Int., D-Wiesbaden-Biebrich) stattfand, wurde alle drei Tage durchgeführt. Die Zellen, die für ein Assay genutzt wurden, wurden zusätzlich 3-4 Tage vor dem Assay in eine 600ml Kulturflasche (Greiner GmbH, D-Frickenhausen) passagiert, um genügend Zellen für den Assay verfügbar zu haben. Zum Passagieren der Zellen wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche dekantiert und anschließend 12ml PBS bei der kleinen Flasche bzw. 30ml PBS bei der großen Flasche hinzugegeben und drei Minuten inkubiert. Dadurch wurden vorhandene Kalziumionen auf der Zellschicht ausgewaschen, die das anschließend zugegebene Trypsin, zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden, inaktivieren würden. Nach erneutem Dekantieren wurde 3ml Trypsin zugegeben und 3-5min inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen vom Flaschenboden war makroskopisch durch eine Trübung der Flüssigkeit unter Licht gut erkennbar. Nach Zugabe von 20 bzw. 30ml Kulturmedium konnten 1,5ml der Zellsuspension in neue 250ml Flaschen passagiert oder die Zellen für den Assay aufbereitet werden.

### ***2.9.3.3. Vorbereitung der Zellen für den TNF-Bioassay***

Für den Assay musste eine Suspension von 500 Zellen/μl Assaymedium hergestellt werden. Zunächst wurde die Zellsuspension für 10min bei 2300 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen daraufhin mit 20ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zwei mal wiederholt. Dann wurde ein letztes mal mit 4ml Kulturmedium resuspendiert und anschließend 50μl der Suspension entnommen, auf eine Zählkammer (Hämozytometer nach Thoma, Fa. Kretschmer, D-Gießen) gegeben und die

lebenden Zellen in insgesamt 80 Kleinstquadraten ausgezählt (siehe auch 2.9.2.3.). Anhand der ausgezählten Zellzahl (AZ) wurde mit Hilfe einer Formel ( $V = 500/50 \times AZ$ ) eine Zellsuspension mit der gewünschten Konzentration von 500 Zellen/ $\mu$ l Medium hergestellt. Dieser Suspension wurden zusätzlich 4 $\mu$ g Actinomycin-D/ml Suspension (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) zugefügt, das entspricht 4 $\mu$ l Stocklösung Actinomycin/ml Zellsuspension (Tab. 10). Dies stoppte einerseits das weitere Zellwachstum und andererseits erhöhte es die Empfindlichkeit der Zellen um das 50 bis 100fache (Fiers 1991).

| Bezeichnung   | Zusammensetzung   | Hersteller  |
|---|---|---|
| Assaymedium<br>bzw.<br>Wachstums-Medium                               | 500ml RMPI-Medium<br>55ml fetales Kälberserum (FCS)<br>5ml Glutamin (200nM)<br>5ml Penicillin-Streptomycin<br>(50000 IU/ml) | Life Technologies,<br>Schottland-Paisley  |
| TNF $\alpha$ -Standard  | 500 $\mu$ l TNF $\alpha$ (100pg/ml)   | National Institute for Biological<br>Standards and Control (NIBSC),<br>UK-Potters Bar |
| Qualitätskontrolle I<br>(QK-I)  | 500 $\mu$ l TNF $\alpha$ (10pg/ml)  | NIBSC,<br>UK-Potters Bar  |
| Qualitätskontrolle II<br>(QK-II)                                      | 500 $\mu$ l TNF $\alpha$ (25pg/ml)  | NIBSC,<br>UK-Potters Bar  |
| MTT<br>3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)2,5-<br>Diphenyl-Tetrazoliumbromid) | 0,1g MTT<br>aufgelöst in 20ml PBS   | Sigma Chemicals,<br>USA-St.Louis, MO  |
| Isopropanol/HCl-Lsg.<br>(0,04M)                                       | 4ml 2N HCl<br>196ml Isopropanol   | Merck,<br>D-Darmstadt   |
| Actinomycin-D<br>(Zytostatikum)                                       | 1ml einer Stocklösung (1mg/ml)<br>5ml PBS   | Sigma Chemicals,<br>USA-St.Louis, MO  |

**Tab. 10**

**Auflistung der im TNF-Bioassay verwendeten Lösungen und Substanzen, ihre Zusammensetzung sowie ihre Hersteller.**

#### 2.9.3.4. Durchführung des TNF-Bioassays

Nachdem am ersten Tag die Platten beschriftet und die Vorverdünnungen der Plasmaproben angelegt wurden, konnte mit der Durchführung des TNF-Assays begonnen werden. Der Assay wurde auf sterilen Mikrotiterplatten (Cellstar®, Greiner, D-Frickshausen) mit 96 Vertiefungen durchgeführt (Tab. 11). Das Beschicken der Mikrotiterplatten geschah auf die gleiche Weise wie in 2.9.2.4. beschrieben (Tab. 11). Der Unterschied zum IL-6-Assay bestand lediglich darin, dass im TNF-Assay anstatt des IL-6-Standards und der IL-6-QK der TNF $\alpha$ -Standard und die TNF $\alpha$ -QK verwendet wurden. Waren alle Platten korrekt beschickt, mussten diese für 24h im Brutschrank bei 37°C inkubieren. Am Folgetag wurden 25 $\mu$ l des Farbstoffs



MTT (Tab. 10) in jede Vertiefung außer A1 einpipettiert und anschließend für 4h im Brutschrank inkubiert.

|   | A      | B        | C           | D           | E             | F             | G              | H              | I              | J               | K              | L          |
|---|--------|----------|-------------|-------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|------------|
| 1 | Blank  | Standard | 1:1<br>50pg | 1:2<br>25pg | 1:4<br>12,5pg | 1:8<br>6,25pg | 1:16<br>3,13pg | 1:32<br>1,56pg | 1:64<br>0,78pg | 1:128<br>0,39pg | 1:256<br>0,2pg | Medium     |
| 2 | QK-I   | QK-I     | 1:1<br>A2   | 1:1<br>B2   | 1:2<br>C2     | 1:2<br>D2     | 1:4<br>E2      | 1:4<br>F2      | 1:8<br>G2      | 1:8<br>H2       | 1:16<br>I2     | 1:16<br>J2 |
| 3 | QK-II  | QK-II    | 1:1<br>A3   | 1:1<br>B3   | 1:2<br>C3     | 1:2<br>D3     | 1:4<br>E3      | 1:4<br>F3      | 1:8<br>G3      | 1:8<br>H3       | 1:16<br>I3     | 1:16<br>J3 |
| 4 | Proben | Proben   | 1:1<br>A4   | 1:1<br>B4   | 1:2<br>C4     | 1:2<br>D4     | 1:4<br>E4      | 1:4<br>F4      | 1:8<br>G4      | 1:8<br>H4       | 1:16<br>I4     | 1:16<br>J4 |
| 5 | Proben | Proben   | 1:1<br>A5   | 1:1<br>B5   | 1:2<br>C5     | 1:2<br>D5     | 1:4<br>E5      | 1:4<br>F5      | 1:8<br>G5      | 1:8<br>H5       | 1:16<br>I5     | 1:16<br>J5 |
| 6 | Proben | Proben   | 1:1<br>A6   | 1:1<br>B6   | 1:2<br>C6     | 1:2<br>D6     | 1:4<br>E6      | 1:4<br>F6      | 1:8<br>G6      | 1:8<br>H6       | 1:16<br>I6     | 1:16<br>J6 |
| 7 | Proben | Proben   | 1:1<br>A7   | 1:1<br>B7   | 1:2<br>C7     | 1:2<br>D7     | 1:4<br>E7      | 1:4<br>F7      | 1:8<br>G7      | 1:8<br>H7       | 1:16<br>I7     | 1:16<br>J7 |
| 8 | Proben | Proben   | 1:1<br>A8   | 1:1<br>B8   | 1:2<br>C8     | 1:2<br>D8     | 1:4<br>E8      | 1:4<br>F8      | 1:8<br>G8      | 1:8<br>H8       | 1:16<br>I8     | 1:16<br>J8 |

**Tab. 11**

**Schema zum Beschicken einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Beschreibung im Text).**

Nach dieser Inkubationszeit war kein steriles Arbeiten mehr erforderlich. Nun wurden aus allen Vertiefungen der Platten 125µl der Flüssigkeit abpipettiert und verworfen, ohne die am Boden liegenden Zellen mitzuerfassen. Daraufhin wurde in alle Vertiefungen außer A1 100µl des Isopropanol-HCl-Gemisches (Tab. 11) gegeben, welches die Zellwände und Zellorganellen zerstörte und die zuvor in den Mitochondrien gebildeten violetten Formazankristalle frei werden ließ und auflöste. Schließlich wurde nochmals für 12h bei 37°C im Brutschrank unter Lichtschutz inkubiert. Am Folgetag konnte die optische Dichte der Formazankristalle jeder Vertiefung mittels eines Photometers (ELISA-Reader, Digiscan, Asys Hitech., A-Eugendorf) bei 550nm bestimmt werden.

## 2.10. Auswertung und Statistik

### 2.10.1. Histologie

Die immunhistochemisch einzelmarkierten Gehirnschnitte wurden mit der Durchlicht-Mikroskopie und die dreifachmarkierten Schnitte mit der Immunfluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet.

#### **2.10.1.1. Durchlicht-Mikroskopie**

Die Analyse der DAB-gefärbten (Tab. 7) Schnitte aus der „free-floating-Methode“ (2.8.3.2.) wurde mit einem Olympus BX50 F4 Mikroskop (Olympus optical, D-Hamburg) im Durchlichtverfahren durchgeführt. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden digitale Bilder mit einer Olympus Camedia C-3030 Zoom Digital-Kamera aufgenommen. Diese wurde von der Olympus Camedia Master 2.0 Software unterstützt. Zur Visualisierung der Bilder zum Zeitpunkt der Aufnahme auf dem Computer-Bildschirm diente eine in den Computer eingebaute Televisions-Karte und die WinTV 32 Software. Die Bildbearbeitung wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems Incorporated, Kalifornien-San Jose) im Farbmodus RGB durchgeführt. Durch das Anpassen der Helligkeit, des Kontrasts sowie der Farbbalance wurden ausgewählte Bilder optimiert und anschließend in diesem Programm zu Bildtafeln zusammengefügt. Anhand der Schnitte wurden die durch zentrale Leptingaben induzierten nukleären STAT5-Signale semi-quantitativ in einer Tabelle zusammengefasst. Hierzu wurde eine fünfstufige Skala benutzt: +++ wurde für eine hohe, ++ für eine mittlere und + für eine niedrige nukleäre Signaldichte vergeben,  $\pm$  gibt nur vereinzelte und – gar keine nukleären STAT5-Signale an. Nachdem die nukleären STAT5-Signale in den hypothalamischen Kerngebieten eines jeden Tieres auf diese Weise quantifiziert wurden, wurden die Bewertungen aller Tiere eines Perfusionszeitpunktes arithmetisch gemittelt und tabellarisch aufgeführt (Tab. 18).

#### **2.10.1.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Dieses Verfahren wurde angewandt, um die Gehirnschnitte, die in der „Fluoreszenz-Methode“ (2.8.3.3.) dreifach markiert wurden, histologisch auszuwerten. Die Gehirnpräparate wurden mit einem Olympus BX50 F4 Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus Optical, D-Hamburg) mittels unterschiedlichen Filterblöcken analysiert. Die Anregung der auf dem Gewebe gebundenen Fluorophore (2.8.3.3.) mit Licht geeigneter Wellenlänge führte nach entsprechender Filterung zu einer längerwelligen Emissionsstrahlung der angeregten Fluorophore. So wurde das Ak-gekoppelte FITC sowie Alexa Fluor 488 (beide Tab. 6) durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 450-490nm angeregt, was zu einer Emission von grünem Licht mit einer Wellenlänge von 510-530nm führte. Cy<sup>TM</sup>3 gekoppelt mit Streptavidin (Tab. 6) führte durch gefiltertes Licht mit einer Wellenlänge von 510-530nm zur Emission von rotem Licht mit einer Wellenlänge von 630-660nm. Angeregtes DAPI, dem zellkernspezifischen Marker (Tab. 7), mit Licht einer Wellenlänge von 358nm, emittierte

blaues Licht mit einer Wellenlänge von 461nm. Durch die unterschiedliche Anregung von verschiedenen Fluorophor-gekoppelten Ak war eine Mehrfachmarkierung möglich. Die Dokumentation wurde mit einer digitalen schwarz-weiß-Kamera (Spot Insight B/W, Diagnostic Instruments, USA-Michigan) und entsprechender Software (Metamorph 5.05), mit welcher die Bilder anschließend bearbeitet werden konnten, durchgeführt. Diese in schwarz-weiß aufgenommenen Bilder wurden nachträglich so eingefärbt, dass STAT3 bzw. STAT5 rot, DAPI blau und NeuN, GFAP sowie vW grün erschienen. Zum Nachweis des nukleären Ursprungs von STAT3- bzw. STAT5-Signalen wurden gleiche Ausschnitte von STAT3 bzw. STAT5 und DAPI übereinander gelagert, so dass pink erscheinende Signale eine spezifisch nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Translokation anzeigten. Durch die Übereinanderlagerung gleicher Ausschnitte von STAT3 bzw. STAT5 und den zellspezifischen Markern NeuN, GFAP und vW konnte der Nachweis von zellspezifischen Kolo-kalisationen geführt werden. Zur endgültigen Bildbearbeitung und Erstellung von Bildtafeln wurde das Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 5.5 benutzt.

|     | Behandlung | 30'                      | 60'                      | 90'                      | 120'                     | 150'                     |
|-----|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ARC | Leptin     | 2 Tiere<br>6 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte |
|     | NaCl       | 1 Tier<br>3 Ausschnitte  | 1 Tier<br>3 Ausschnitte  | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 1 Tier<br>3 Ausschnitte  |
| RCH | Leptin     | 2 Tiere<br>6 Ausschnitte | 3 Tiere<br>7 Ausschnitte | 3 Tiere<br>7 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>7 Ausschnitte |
|     | NaCl       | 1 Tier<br>3 Ausschnitte  | 2 Tiere<br>6 Ausschnitte | 3 Tiere<br>7 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 1 Tier<br>3 Ausschnitte  |
| PMV | Leptin     | 2 Tiere<br>6 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte |
|     | NaCl       | 1 Tier<br>3 Ausschnitte  | 1 Tier<br>3 Ausschnitte  | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 1 Tier<br>3 Ausschnitte  |

Tab. 12

Übersicht der für die quantitative Auswertung der nukleären STAT5-Translokation im einzelnen ausgezählten Ausschnitte von verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten (ARC, RCH und PMV) der Leptin-stimulierten Ratten und der Kontrolltiere zu unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten (30 bis 150min).

Anhand der Schnitte wurden die durch systemisch appliziertes Leptin induzierten nukleären STAT3- bzw. STAT5-Signale semi-quantitativ in einer Tabelle zusammengefasst. Hierzu wurde eine Skala mit denselben fünf Stufen, wie in 2.10.1.1. beschrieben, benutzt. Anschließend wurden die Bewertungen aller Tiere eines Perfusionszeitpunktes arithmetisch gemittelt und in Tab. 19 und Tab. 17 eingetragen. Weiterführend wurden die STAT3- bzw. STAT5-Signale in unterschiedlichen hypothalamischen Kerngebieten ausgezählt. Bei der STAT5-Zählung wurden für verschiedene Perfusionszeitpunkte (30 bis 150min) die nukleären

STAT5-Signale im ARC, der RCH und dem PMV quantitativ erfasst und ins Verhältnis zu allen DAPI-markierten Zellen im Ausschnitt gesetzt. Die Anzahl der Tiere und die ausgezählten Ausschnitte sind in Tab. 12 aufgeführt. Zusätzlich wurde für den ARC, die RCH, den PMV, den SO und den TM zum Zeitpunkt der stärksten STAT5-Aktivierung, 120min nach der Stimulation (Tab. 19), alle STAT5-positiven Neurone ausgezählt und mit den Werten der Kontrolltiere verglichen. Für die neuronale Auswertung wurden folgende Anzahlen an Tieren und Ausschnitten ausgezählt (Tab. 13).

|               | ARC                      | RCH                      | PMV                      | SO                       | TM                       |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Leptin</b> | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>5 Ausschnitte |
| <b>NaCl</b>   | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte |

**Tab. 13**

**Übersicht der für die quantitative Auswertung der STAT5-positiven Neurone im einzelnen ausgezählten Ausschnitte von verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten (ARC, RCH, PMV, SO und TM) 120min nach der Stimulation.**

Zur Verdeutlichung des Unterschiedes zwischen der nukleären Translokation im ARC von STAT3 und STAT5 nach systemischer Applikation von Leptin wurde die nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Translokation 90min nach der Stimulation ausgezählt und jeweils mit den Kontrolltieren verglichen. Für die Auswertung wurden folgende Anzahlen an Tieren und Ausschnitten ausgezählt (Tab. 14).

|               | STAT3<br>90min           | STAT5<br>120min          |
|---------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Leptin</b> | 2 Tiere<br>6 Ausschnitte | 3 Tiere<br>9 Ausschnitte |
| <b>NaCl</b>   | 2 Tiere<br>5 Ausschnitte | 3 Tiere<br>8 Ausschnitte |

**Tab. 14**

**Übersicht der für die quantitative Auswertung der STAT3- und STAT5-positiven Zellen im einzelnen ausgezählten Ausschnitte aus dem ARC 90min (STAT3) und 120min (STAT5) nach der Stimulation.**

Die ausgezählten nukleären STAT3- bzw. STAT5-Signale jeden Ausschnitts eines Kerngebiets pro Tier wurden mit Hilfe des Kalkulationsprogramms Microsoft Excel 7.0 (Microsoft Corporations, WA-Redmond) arithmetisch gemittelt und der prozentuale Anteil der STAT3- bzw. STAT5-positiven Zellen an allen DAPI-markierten Zellen errechnet, bevor der Mittelwert aller Tiere eines Perfusionszeitpunktes gebildet wurde. Von den Werten wurde zusätzlich der Standardfehler errechnet. Die graphische Darstellung der gemittelten Werte und deren Standardfehler wurden mit Hilfe des Kalkulationsprogramms Graph Pad Prism 3.0 (Graph Pad Software, CA-San-Diego) durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden die

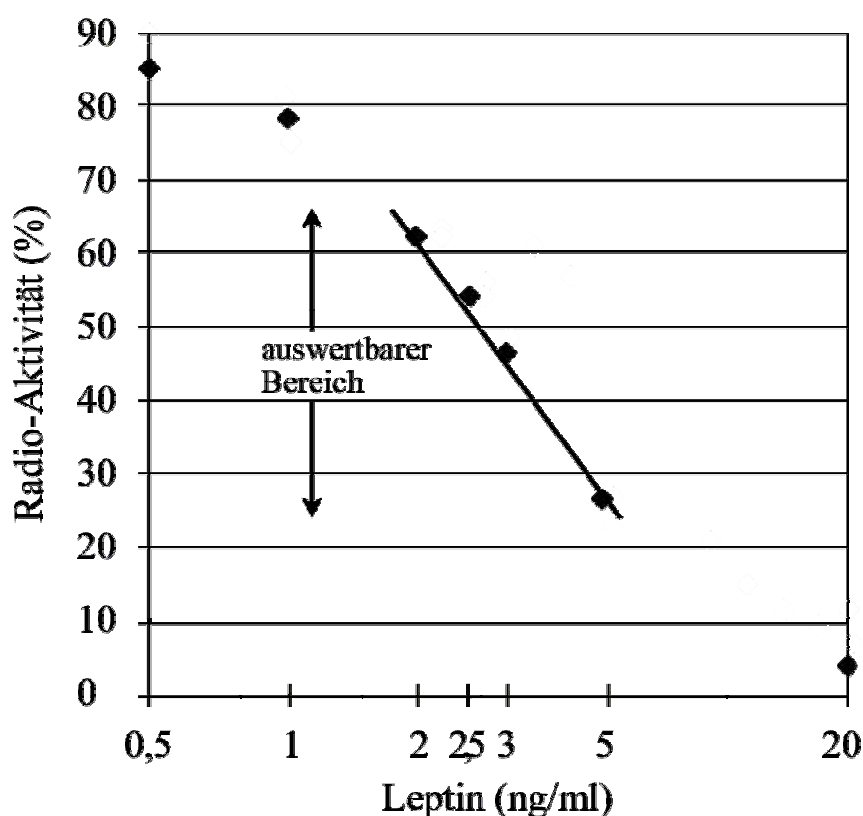
Werte der Leptin-behandelten Ratten und die der Kontrolltiere mit dem Perfusionszeitpunkt 120min mit dem Statistikprogramm SigmaStat (Jandel Scientific, CA-Corte Madera) mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und einem angeschlossenen Student-Newman-Keuls *post-hoc*-Test verglichen. Anschließend wurde auf dem 5%-Niveau ermittelt, ob ein signifikanter Unterschied vorlag. Der Signifikanzwert musste dabei unter 0,05 liegen.

### **2.10.2. Auswertung der Assays**

#### **2.10.2.1. Leptin-Radioimmunoassay**

Zur Ermittlung des Leptingehalts in den zu untersuchenden Plasmaproben mittels Radioimmunoassay wurde ein kommerzieller Kit (Maus-Leptin RIA-Kit, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln) verwendet (2.9.1.). Für jeden Assay wurde eine Eichkurve (Abb. 20) errechnet, die auf Doppelbestimmungen von sieben verschiedenen Leptinstandards (ebenfalls im Kit enthalten, Maus-Leptin RIA-Kit, Biotrend Chemikalien GmbH, D-Köln) basierte. Zur Bewertung der gemessenen Radioaktivität waren drei Kontrollansätze notwendig. Der erste (TO) enthielt nur das radioaktiv markierte Ag (Tracer) und emittierte somit 100% der eingesetzten Radioaktivität. Der zweite Ansatz (NSB) enthielt zusätzlich einen Puffer. Dieser zeigte den prozentualen Anteil der eingesetzten Radioaktivität an, welcher durch unspezifische Bindungen an den Puffer und an die Reaktionsgefäßwände verloren ging. Der NSB/TO-Wert lag in allen durchgeführten RIAs unter den geforderten 5%. Der dritte Ansatz war eine Leerprobe (Bo) und enthielt zusätzlich den spezifischen Ak, jedoch kein unmarkiertes Ag. Er zeigte die maximale Bindungsaktivität des Tracers an den Ak an. Beim Entnehmen der Blutproben fand eine Verdünnung in einer definierten Menge Heparin-Lösung statt (0,01ml), die bei der Berechnung der endgültigen Leptin-Konzentration berücksichtigt werden musste. Die Multiplikation des RIA-Messwertes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor ergab die Leptin-Konzentration bezogen auf 100µl Plasma. Zur Analyse wurden solche Verdünnungen für die zu analysierenden Proben ausgewählt, die in den linearen, auswertbaren Bereich der Eichkurve fielen, somit kam es zu einem zweiten Verdünnungsschritt, der ebenfalls durch einen entsprechenden Faktor in die Auswertung der RIA-Daten mit einbezogen werden musste. Allein eine Multiplikation des RIA-Wertes mit dem errechneten Verdünnungsfaktor führte aber in beiden Fällen nicht zu einem korrekten Endwert. Auf der Basis der Angaben einer Tabelle, welche dem RIA-Kit beigelegt war, wurden die RIA-Werte für die Proben zunächst mit dem jeweiligen

Verdünnungsfaktor multipliziert und anschließend durch eine Reduktion dieses Wertes um 5-15%, abhängig vom Absolutwert und von der Stärke der Verdünnung, der Endwert in ng/ml ermittelt. Die Werte des zirkulierenden Leptins jedes Tieres eines Perfusionszeitpunktes wurden anschließend mit Hilfe des Kalkulationsprogramms Microsoft Excel 7.0 arithmetisch gemittelt und die Mittelwerte graphisch dargestellt.

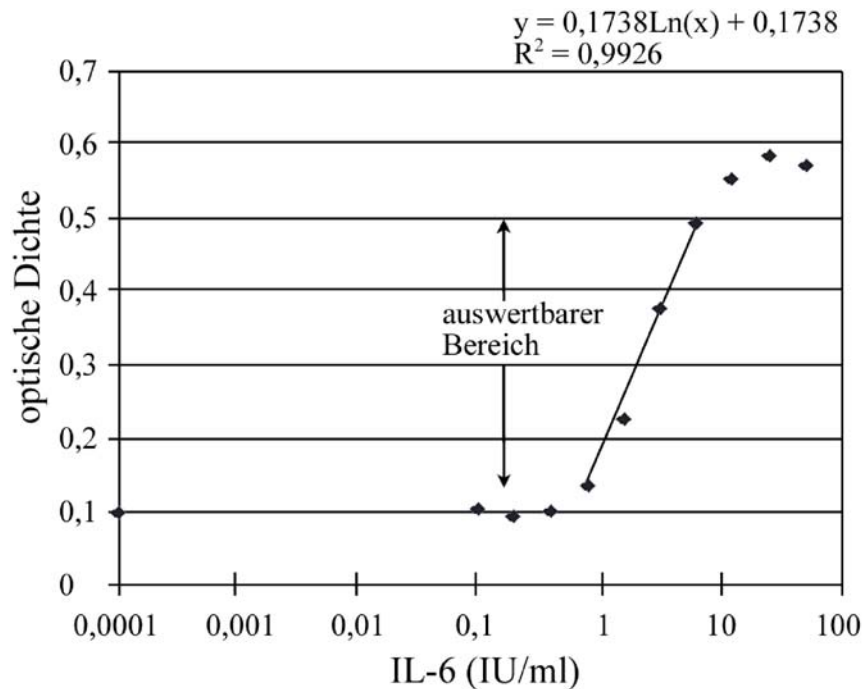


**Abb. 20**  
Darstellung einer Eichkurve eines Leptin-Radioimmunoassays. Mit Einzeichnung des auswertbaren Bereichs.

#### 2.10.2.2. IL-6-Bioassay

Die photometrisch erhobenen Daten aus den Assays wurden mit Hilfe des Kalkulationsprogramms Microsoft Excel 7.0 ausgewertet. Um eine Eichkurve zu erstellen, wurden die Standardwerte der Absorption bzw. der optischen Dichte auf der Ordinate gegen ihre jeweiligen IL-6-Konzentrationen auf der Abszisse aufgetragen (Abb. 21). Dann wurden die Verdünnungen der einzelnen Proben ausgewählt, die in den auswertbaren Bereich (linearer Teil) der Eichkurve fielen. Deren IL-6-Konzentration (IU/ml) wurde unter Zuhilfenahme der Regressionsgleichung der Eichkurve und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der jeweiligen Probe errechnet. Die IL-6-Konzentration in der Probe war in einem bestimmten Konzentrationsbereich umso höher, je höher die optische Dichte war, die bei 550nm gemessen wurde. In diesem Konzentrationsbereich wurden die Zellen proportional zum IL-6-Gehalt der Probe zu stärkerem Wachstum stimuliert. Entsprechend

mehr MTT wurde von der größeren Zellzahl mitochondrial zu blauen Formazankristallen verstoffwechselt. Die Quantität dieser durch die Isopropanol/HCl-Lösung aufgelösten (Tab. 8) Formazankristalle wurde nach der Zelllyse bei 550nm gemessen. Die Werte des zirkulierenden IL-6 jedes Tieres eines Perfusionszeitpunktes wurden mit Hilfe des Kalkulationsprogramms Microsoft Excel 7.0 arithmetisch gemittelt und die Mittelwerte graphisch dargestellt (3.4.2.).

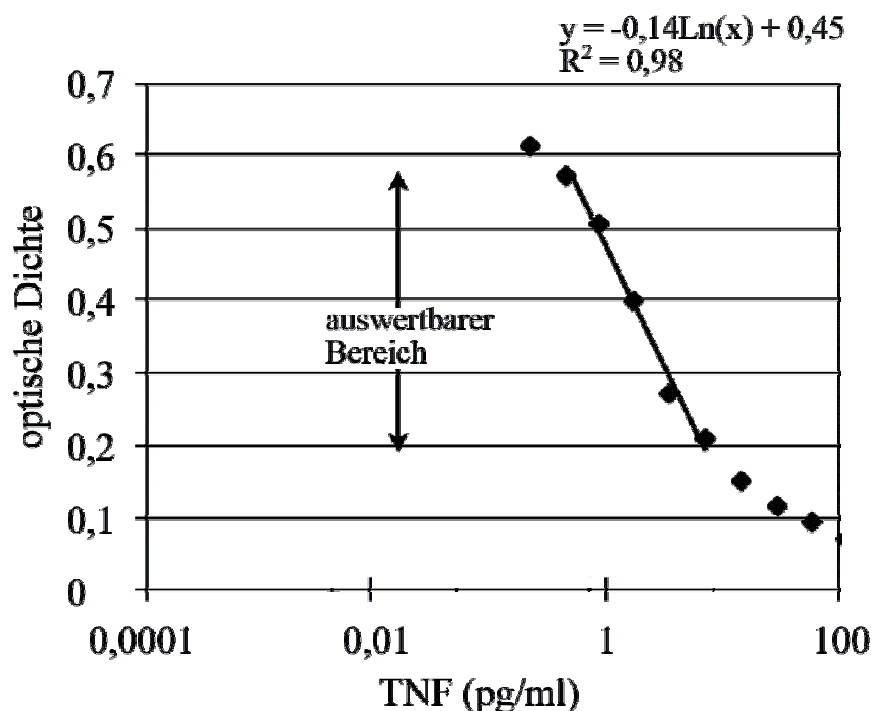


**Abb. 21**  
Darstellung einer Eichkurve eines IL-6-Assays einschließlich der Regressionsgleichung des linearen Anteils der Kurve (auswertbarer Bereich).

### 2.10.2.3. TNF-Bioassay

Zur Auswertung des TNF-Bioassays wurden, unter Zuhilfenahme des Kalkulationsprogramms Microsoft Excel 7.0, die gemittelten Absorptionswerte der Standards auf der Ordinate gegen ihre jeweilige bekannte TNF-Konzentration auf der Abszisse aufgetragen und hieraus eine Eichkurve erstellt. Zur Analyse wurden solche Verdünnungen für die zu analysierenden Proben ausgewählt, die in den linearen, auswertbaren Bereich der Eichkurve fielen (Abb. 22). Mit steigender TNF-Aktivität in der Probe sank auch die Zahl der überlebenden Zellen und damit die Menge der in den Mitochondrien aus dem gelben Farbstoff MTT (Tab. 10) verstoffwechselten violetten Formazankristallen, so dass die Konzentration an violettem Farbstoff nach der Zelllyse und Auflösen der Kristalle in den Vertiefungen geringer wurde. Die Probe hatte dadurch eine geringere optische Dichte. Unter Verwendung der Regressionsformel (Abb. 22) konnte nach Einsetzen der entsprechenden Absorptionswerte,

welche innerhalb des auswertbaren Bereichs lagen, und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration an TNF in der Probe errechnet werden.



**Abb. 22**  
Darstellung einer Eichkurve eines TNF-Assays einschließlich der Regressionsgleichung des linearen Anteils der Kurve (auswertbarer Bereich).

## 2.11. Versuchsprotokolle

### 2.11.1. i.c.v.-Applikation

Es wurden insgesamt elf Ratten, davon sechs mit 2µl Leptin in einer Konzentration von 1,753µg/µl und fünf mit 2µl 0,9%iger NaCl-Lösung zentral stimuliert. Die Ratten wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der Stimulation perfundiert (2.5.2.). Von den Leptin-behandelten Ratten wurden zwei 30min, zwei 60min und zwei 120min nach der Stimulation getötet. Von den Kontrolltieren wurden vier 30min und eine 120min *post injectionem* perfundiert. Die Gehirne wurden zum Nachweis der Leptin-induzierten STAT5-Translokation durch Einzelmarkierung mittels der „free-floating-Methode“ (2.8.3.2.) immunhistochemisch ausgewertet.

| STAT5 i.c.v. | 30 min | 60 min | 120 min | Summe |
|--------------|--------|--------|---------|-------|
| NaCl         | 4      | n.n.   | 1       | 5     |
| Leptin       | 2      | 2      | 2       | 6     |

**Tab. 15**  
Auflistung der für die Versuche im einzelnen verwendeten Tierzahlen.  
n.n. = nicht belegt.



### 2.11.2. i.p.-Applikation

Zum Nachweis der STAT3-Translokation wurden insgesamt 14 Leptin-behandelte und sieben NaCl-behandelte Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten *post injectionem* perfundiert, um die Zeitabhängigkeit der Leptin-induzierten STAT3-Translokation zu untersuchen (Tab. 16). Von den 14 Leptin-behandelten Tieren wurden zwei 30min, vier 60min, vier 90min, drei 120min und ein Tier 150min nach der Stimulation perfundiert. Von den sieben mit NaCl behandelten Ratten wurden zwei 60min, vier 90min und eine 120min *post injectionem* getötet.

| STAT3 i.p. | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 150 min | Summe |
|------------|--------|--------|--------|---------|---------|-------|
| NaCl       | n.n.   | 2      | 4      | 1       | n.n.    | 7     |
| Leptin     | 2      | 4      | 4      | 3       | 1       | 14    |

| STAT5 i.p. | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min | 150 min | 240 min | Summe |
|------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|-------|
| NaCl       | 1      | 2      | 3      | 3       | 1       | 1       | 11    |
| Leptin     | 2      | 3      | 3      | 4       | 3       | 1       | 16    |

**Tab. 16**

**Auflistung der für die Versuche im einzelnen verwendeten Tierzahlen.**

Die periphere Stimulation wurde an insgesamt 48 Tieren durchgeführt (Tab. 16). Davon wurden 30 Ratten mit 1ml Leptin in einer Dosis von 5mg/kg KM und 18 Ratten mit 1ml 0,9%iger NaCl-Lösung stimuliert. Zum Nachweis der STAT5-Translokation wurden 16 Leptin- und elf NaCl-behandelte Ratten perfundiert. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stimulation getötet, um die Zeitabhängigkeit der Leptin-induzierten STAT5-Translokation zu untersuchen. Von den 16 Leptin-stimulierten Tieren wurden zwei 30min, drei 60min, drei 90min, vier 120min, drei 150min und eins 240min nach der Stimulation perfundiert, wohingegen von den elf NaCl-behandelten Tieren eins 30min, zwei 60min, drei 90min, drei 120min, eins 150min und eins 240min *post injectionem* getötet wurden.

Alle Gehirne wurden immunhistochemisch zum Nachweis der Leptin-induzierten STAT3- bzw. STAT5-Translokation mit der Einzel- bzw. Dreifachmarkierung (2.8.3.) ausgewertet.

### **3. KAPITEL: Ergebnisse**

#### **3.1. Nachweis des Transkriptionsfaktors STAT3 nach peripherer Stimulation**

##### ***3.1.1. Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT3-Translokation***

Zum Vergleich der peripheren (i.p.) Leptin-Stimulation (5mg/kg KM, n = 14) mit der peripheren Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung (n = 7) wurden die Gehirnschnitte mittels der Mehrfachmarkierung (2.8.3.3.) mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde insbesondere auf die Verteilung der Leptin-induzierten, nukleären STAT3-Translokation in für die Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes relevanten Kerngebiete des *Hypothalamus* und des Hirnstamms geachtet. Durch eine semi-quantitative Beurteilung der nukleären STAT3-Signale mittels eines fünf-Punkte-Bewertungssystems (3.2.2.1.) wurde ein Vergleich zwischen der Leptin- und der NaCl-Applikation durchgeführt (Tab. 17). Bei der neuroanatomischen Auswertung der Gehirnschnitte fiel auf, dass die nukleäre STAT3-Translokation zeitabhängig auftrat (Abb. 24). Die Signaldichte für die einzelnen Hirnstrukturen erreichte 90min nach der Stimulation ihr Maximum, um dann bis 150min *post injectionem* wieder abzufallen. Die höchste Signaldichte nukleärer STAT3-Immunreaktivität trat im ARC, im DMH, im VMH, im PMV, in der *Area periarquata* (PAA) und in der RCH auf. In geringer Signaldichte bis vereinzeltem Auftreten war auch in der ME, dem Pe, dem SCh und der LH eine nukleäre STAT3-Translokation zu verzeichnen. Zusätzlich waren nukleäre STAT3-Signale im Sol, der in der *Medulla oblongata* lokalisiert ist, in mittlerer Signaldichte sowie in vereinzelter Ausbreitung auch in anderen Hirnstrukturen wie dem Pir, der *Fissura hippocampi* (HiF), dem *Nucleus habenularis medialis* (MHb) und der PH vertreten. In vereinzelter bis mittlerer Ausprägung waren auch in nicht-neuronalen Zellen nukleäre STAT3-Signale zu finden. So konnte in Endothelzellen in mittlerer Signaldichte und in Zellen des PC der *Ventriculi laterales* (V<sub>l</sub>) nur in vereinzelter bis niedriger Dichte eine nukleäre STAT3-Expression nachgewiesen werden.

**i.p.-Applikation**

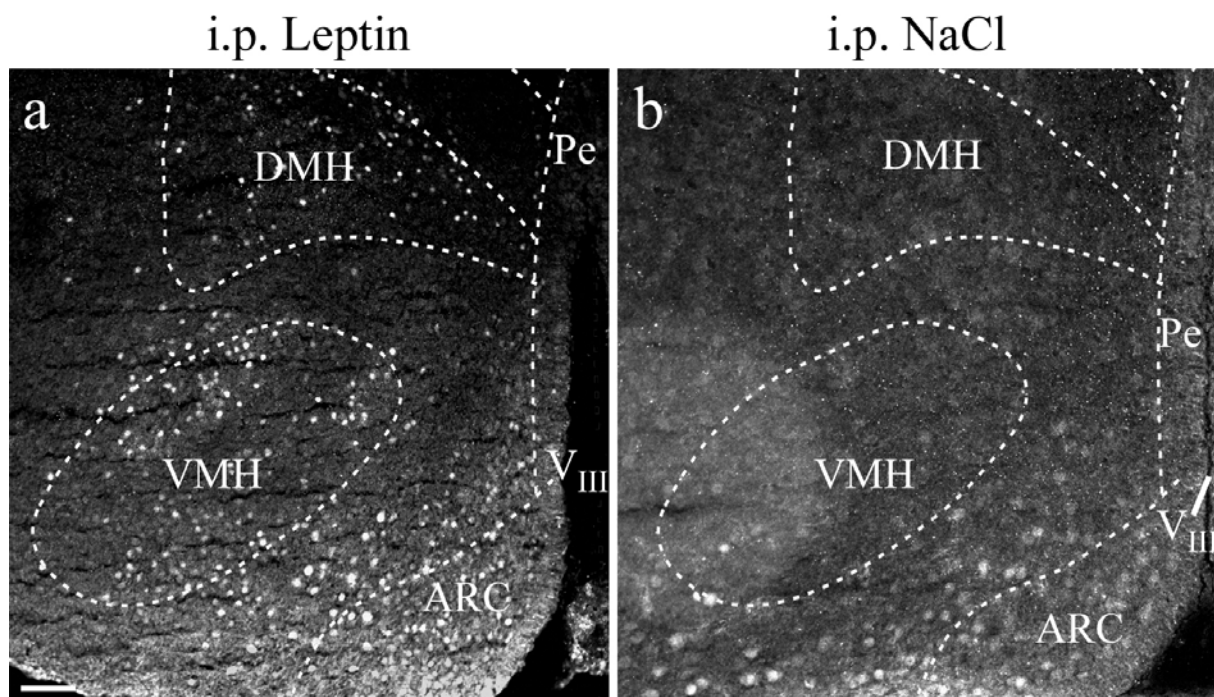
|  | 30'           | 60'           |             | 90'           |             | 120'          |             | 150'          |
|--|---------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
|  | Leptin<br>n=2 | Leptin<br>n=4 | NaCl<br>n=2 | Leptin<br>n=4 | NaCl<br>n=4 | Leptin<br>n=3 | NaCl<br>n=1 | Leptin<br>n=1 |
| <b>Hypothalamische Strukturen</b>                |               |               |             |               |             |               |             |               |
| Area laterale hypothalami (LH)                   | +             | +             | –           | –             | –           | –             | –           | –             |
| Area periarquata (PAA)                           | ++            | ++            | ±           | ++            | ±           | –             | –           | –             |
| Area posterioris hypothalami (PH)                | –             | ±             | –           | –             | –           | –             | –           | –             |
| Area retrochiasmatica (RCH)                      | ++            | ++            | –           | ++            | –           | +             | –           | –             |
| Eminentia mediana (ME)                           | –             | ±             | –           | –             | –           | –             | –           | –             |
| Nucleus arcuatus (Arc)                           | ++            | ++            | ±           | +++           | +           | ±             | ±           | –             |
| Nucleus hypothalamicus dorsomedialis (DMH)       | –             | +             | –           | ++            | –           | –             | –           | –             |
| Nucleus hypothalamicus ventromedialis (VMH)      | +             | ++            | –           | +++           | –           | +             | –           | ±             |
| Nucleus paraventricularis (PaV)                  | –             | –             | –           | –             | –           | –             | –           | –             |
| Nucleus periventricularis (Pe)                   | ±             | ±             | –           | –             | –           | –             | –           | –             |
| Nucleus praemammillaris ventralis (PMV)          | –             | –             | –           | ++            | –           | –             | –           | –             |
| Nucleus preopticus ventromedialis (VMPO)         | ±             | +             | ±           | –             | –           | –             | –           | –             |
| Nucleus suprachiasmaticus (SCh)                  | –             | ±             | –           | –             | –           | –             | –           | –             |
| <b>Medulla oblongata</b>                         |               |               |             |               |             |               |             |               |
| Nucleus tractus solitarius (Sol)                 | ++            | ++            | ±           | ++            | ±           | –             | –           | –             |
| Nucleus tractus solitarius, commissuralis (SolC) | +             | –             | –           | –             | +           | –             | –           | –             |
| <b>Andere Strukturen</b>                         |               |               |             |               |             |               |             |               |
| Cortex piriformis (Pir)                          | –             | –             | –           | ±             | –           | –             | –           | –             |
| Fissura hippocampi (HiF)                         | –             | –             | –           | –             | –           | ±             | –           | –             |
| Nucleus habenularis medialis (MHb)               | –             | +             | –           | –             | –           | –             | –           | –             |
| <b>Andere Zelltypen</b>                          |               |               |             |               |             |               |             |               |
| Cellulae endotheliales                           | +             | ++            | ±           | ++            | –           | ++            | –           | –             |
| Cellulae meningeales                             | +             | +             | +           | +             | +           | ±             | ±           | –             |
| Plexus choroideus (PC)                           | –             | ±             | –           | +             | –           | +             | –           | –             |

**Tab. 17**

**Semi-quantitative Auswertung (arithmetisch gemittelt) der Signaldichte nukleärer STAT3-Immunreaktivität nach peripherer Leptingabe im Vergleich zu den Kontrolltieren nach unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten (30, 60, 90, 120 und 150min). Die Signalhäufigkeit wurde mittels eines fünf-Punkte-Bewertungsschemas ermittelt: +++ = hohe Signaldichte, ++ = mittlere Signaldichte, + = niedrige Signaldichte, ± = nur vereinzelte und – = keine nukleären Signale. Die Grundlage für die Benennung der Kerngebiete und Strukturen bildete der Rattengehirnatlas (Paxinos and Watson 1998).**

Zur bildlichen Darstellung der unterschiedlichen Ausprägung der spezifischen STAT3-Translokation nach Leptin- (a) bzw. NaCl-Behandlung (b) dient Abb. 23. Beide Tiere

wurden 90min nach der Stimulation perfundiert und die STAT3-Moleküle durch die „Fluoreszenz-Methode“ markiert (2.8.3.3.). Die Schnittebene befindet sich in etwa auf Höhe  $-3,3\text{mm}$  von Bregma. Die Abbildung zeigt den Anschnitt der Kerne ARC, VMH und DMH, die PAA sowie den  $V_{III}$ -umgebenden Pe am jeweils rechten Bildrand. Die Signaldichte war in den hier abgebildeten Schnitten nach Leptingabe (Abb. 23a) für den ARC und VMH als hoch einzustufen, wohingegen die Signale im DMH in mittlerer Dichte vertreten waren. Im Gegensatz dazu war die Signaldichte nach NaCl-Applikation (Abb. 23b) für den ARC als niedrig zu bewerten. Im VMH und DMH hingegen waren keine nukleären STAT3-Signale vorhanden.

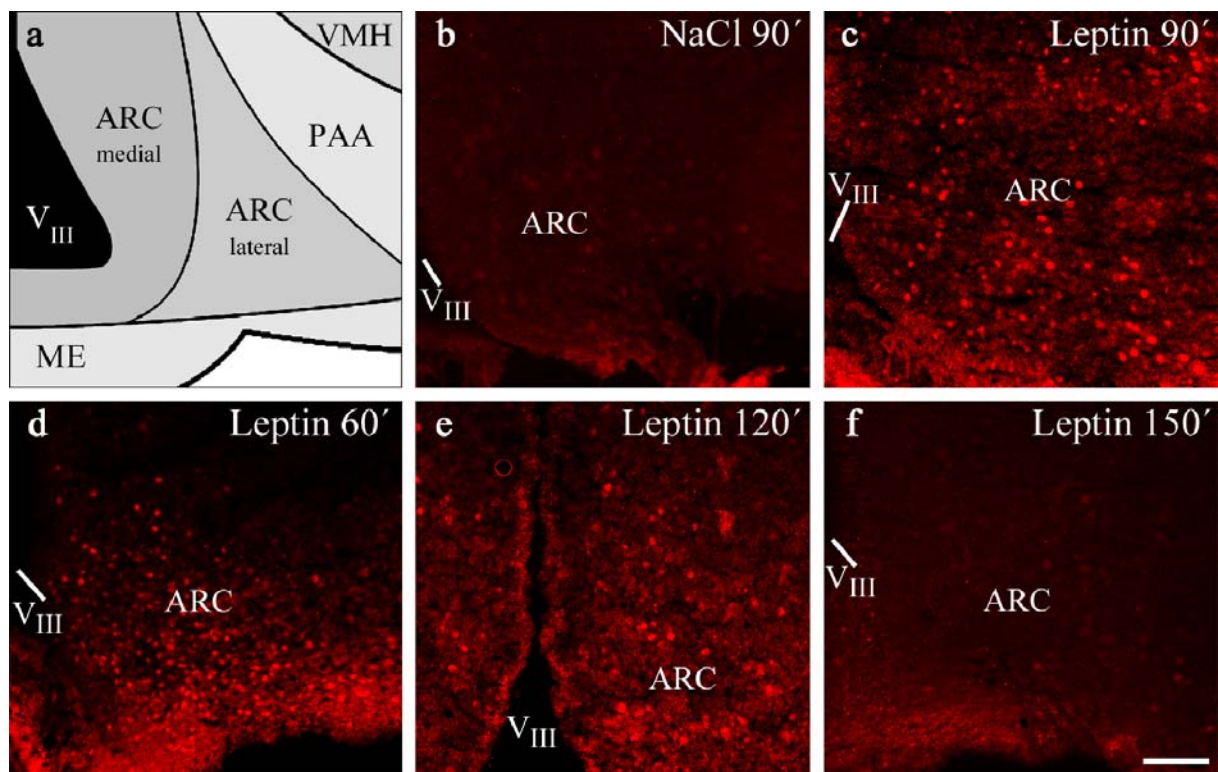


**Abb. 23**

Vergleich der STAT3-Immunreaktivität (weiße Signale) im caudobasalen *Hypothalamus* (Bregma  $-3,3\text{mm}$ ) eines i.p.-Leptin- (a) und eines i.p.-NaCl-stimulierten Tieres (b). Eichbalken für a und b =  $100\mu\text{m}$ .

Die Zeitabhängigkeit der nukleären STAT3-Translokation nach systemischer Stimulation ist in Abb. 24 dargestellt. In dieser Studie wurde der ARC, der sehr gut mit nukleären STAT3-Signalen auf systemische Leptingabe reagierte (Tab. 17), in etwa auf Höhe  $-3,14\text{mm}$  von Bregma ausgewählt. Die Zeitpunkte der Perfusion betrugen zwischen 60 und 150min *post injectionem*. Abb. 24a zeigt schematisch die Region des caudobasalen *Hypothalamus* in der hier betrachteten Schnittebene. Die schwarze Struktur symbolisiert den  $V_{III}$ , der vom ARC, welcher in seine Subkerne ARC-M (medial) und ARC-L (lateral) unterteilt werden kann, umgeben ist. An ihn schließt sich ventral die ME und nach dorsolateral die PAA an. Rechts oben ist der VMH angeschnitten. Abb. 24b zeigt diese hypothalamische Region bei einem

Kontrolltier, das keinerlei STAT3-Signale (rot) aufwies. Die Leptin-induzierten nukleären STAT3-Signale sind in Abb. 24c, -d und -e deutlich als rote Punkte zu sehen. Sie waren 90min nach der Stimulation (Abb. 24c) am intensivsten und kamen im ARC und VMH in hoher Signaldichte vor. Im Gegensatz dazu waren die Signale zum Zeitpunkt 60min (Abb. 24d) zwar noch sehr häufig, aber ihre Intensität war deutlich schwächer. Im weiteren Zeitverlauf (Abb. 24e) wurden sie noch sehr viel schwächer und nahmen auch in ihrer Quantität ab, bis sie schließlich ab 150min *post injectionem* (Abb. 24f) nur noch vereinzelt bei sehr schwacher Intensität zu verzeichnen waren. Die Leptin-induzierten STAT3-Signale waren 90min nach systemischer Applikation vor allem im medialen und lateralen Anteil des ARC vertreten und dort am intensivsten und häufigsten (Abb. 24c).



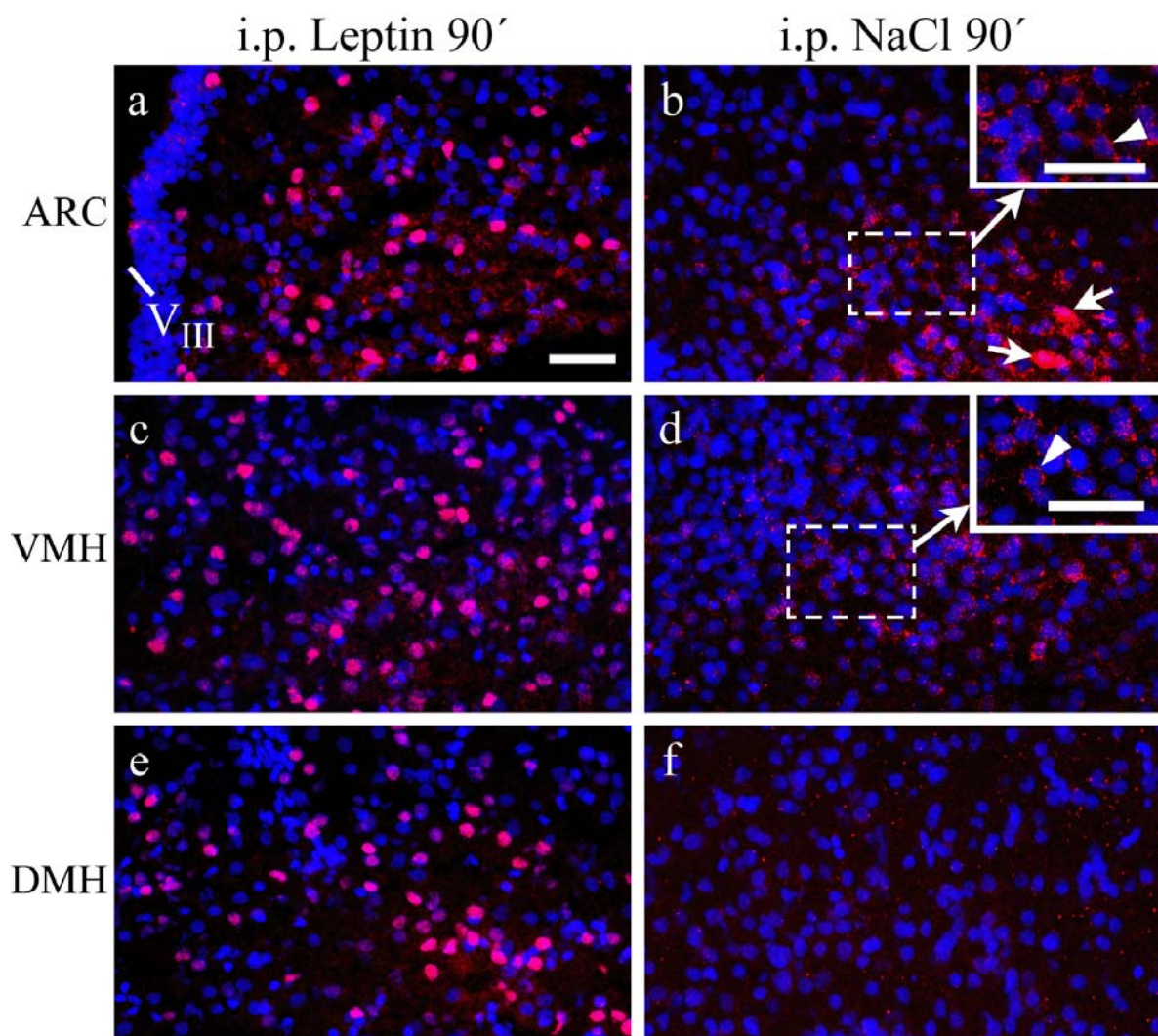
**Abb. 24**

**Zeitabhängigkeit der i.p.-Leptin-induzierten nukleären STAT3-Immunreaktivität (rote Signale) am Beispiel des ARC in etwa auf Höhe -3,14mm von Bregma. a: Schematische Übersicht über die Kerngebiete in dieser Schnittebene. b: Kontrolltier ohne Signale. c: Intensive Signale (rot) 90min nach der Applikation. d: Starke Signale zum Zeitpunkt 60min. e: Abnehmende Intensität der STAT3-Signale nach 120min. f: 150min nach der Stimulation war nur noch eine sehr schwache nukleäre STAT3-Translokation zu vermerken. Eichbalken für b-f = 100µm.**

Die Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tab. 17) wurde für den optimalen Perfusionszeitpunkt 90min in Abb. 25 und Abb. 26 für verschiedene hypothalamische Kerngebiete in Form von mikroskopischen Bildtafeln dargestellt. Auf der linken Seite sind die Hirn-Strukturen der Leptin- und auf der rechten Seite

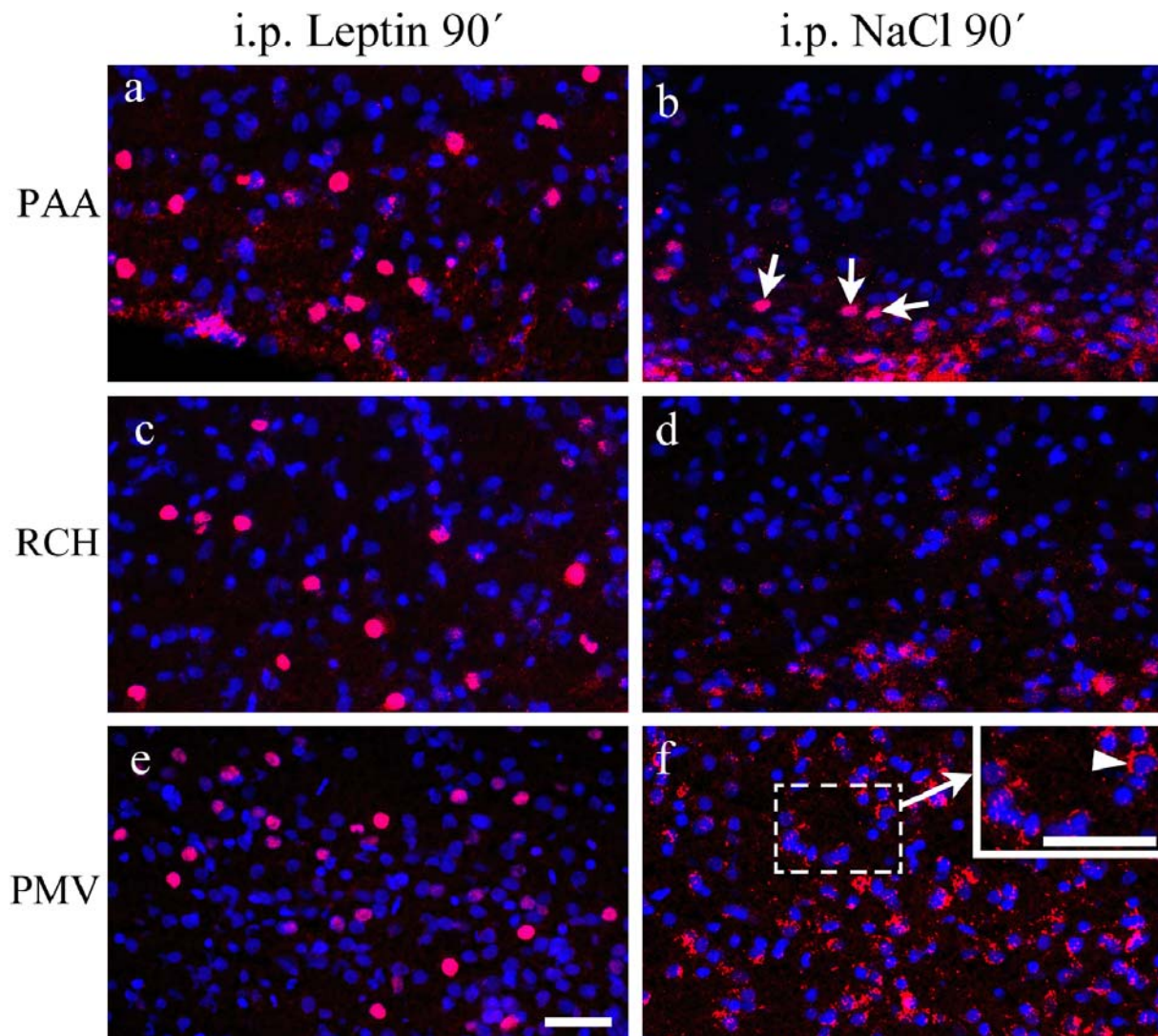


die der NaCl-behandelten Tiere gezeigt. Der nukleäre Ursprung der STAT3-Signale wurde durch die DAPI-Markierung (blau) nachgewiesen. Durch die Überlagerung der blauen DAPI- und der roten STAT3-Markierung desselben Ausschnitts erschienen nukleäre Signale in pinker Farbe. In Abb. 25a und -b sieht man die Gegenüberstellung des medialen ARC eines Leptin-behandelten Tieres (links) und eines Kontrolltieres (rechts). Die nukleäre STAT3-Translokation (pinke Signale) in Abb. 25a war mit sehr großer Wahrscheinlichkeit neuronalen Ursprungs (3.1.2.1.). Im Ausschnitt Abb. 25b hingegen sieht man neben nukleären STAT3-Signalen (Pfeile) überwiegend zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität (Pfeilkopf im Inset von Abb. 25b).



**Abb. 25**  
Gegenüberstellung der STAT3-Immunreaktivität 90min nach i.p.-Applikation von Leptin (links) und NaCl (rechts). Zum Nachweis des nukleären Ursprungs der STAT3-Signale wurde die STAT3- und DAPI-Markierung übereinandergelagert. a: Ausschnitt des ARC mit zahlreichen STAT3-positiven Zellkernen (pink). b: Ausschnitt des ARC mit nur vereinzelten nukleären (Pfeile) aber zahlreichen zytoplasmatischen Signalen (Pfeilkopf). c: VMH mit deutlicher nukleärer Translokation (pink). d: VMH-Ausschnitt mit ausschließlich zytoplasmatischen Signalen (Pfeilkopf). e: DMH-Ausschnitt mit prominenten STAT3-positiven Kernen (pink). f: Ausschnitt des DMH mit weder nukleärer noch zytoplasmatischer STAT3-Immunreaktivität. Eichbalken für a-f sowie die Insets in b und d = 50µm. Für b-f gilt der Eichbalken in a.

Das Gleiche lässt sich in Abb. 25c und -d im VMH und in -e und -f im DMH wiederfinden. Auch hier wurden 90min nach der Stimulation zahlreiche nukleäre STAT3-positive Zellen (Abb. 25c und -e) detektiert. In den Kontrolltieren waren ausschließlich zytoplasmatische im VMH (Pfeilkopf im Inset von Abb. 25d) und keine Signale im DMH (Abb. 25f) zu finden.



**Abb. 26**

Gegenüberstellung der STAT3-Immunreaktivität 90min nach i.p.-Applikation von Leptin (links) und NaCl (rechts). Zum Nachweis des nukleären Ursprungs der STAT3-Signale wurde die STAT3- und DAPI-Markierung übereinandergelagert. a: Ausschnitt der PAA mit prominenten STAT3-positiven Zellkernen (pink). b: Ausschnitt der PAA mit nur vereinzelten nukleären STAT3-Signalen (Pfeile). c: RCH mit deutlicher nukleärer Translokation (pink). d: RCH ohne nukleäre Signale. e: Ausschnitt des PMV mit mehreren nukleären STAT3-Signalen (pink). f: PMV-Ausschnitt mit ausschließlich zytoplasmatischer STAT3-Immunreaktivität (Pfeilkopf). Eichbalken für a-f und Inset in f = 50µm. Für a-d und f gilt der Eichbalken in e.

In Abb. 26 sind die PAA, die RCH und der PMV (-a bis -f) dargestellt. Nach Leptin-Behandlung ließen sich ebenfalls zahlreiche und deutliche nukleäre STAT3-Signale (pink) in diesen Kerngebieten finden (Abb. 26a, -c und -e). Bei den NaCl-behandelten Tieren wurden



in der PAA (Abb. 26b) nur vereinzelt (Pfeile) und in der RCH (Abb. 26d) sowie im PMV (Abb. 26f) keine nukleären STAT3-Signale detektiert. Im PMV (Abb. 26f) lag, wie auch im ARC und VMH, vor allem zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität vor (Pfeilkopf im Inset von Abb. 26f), wohingegen in der RCH (Abb. 26d) und der PAA (-b) nur sehr vereinzelte zytoplasmatische Signale zu finden waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die nukleäre STAT3-Translokation in einigen hypothalamischen Kerngebieten durch systemisch appliziertes Leptin induziert werden konnte.

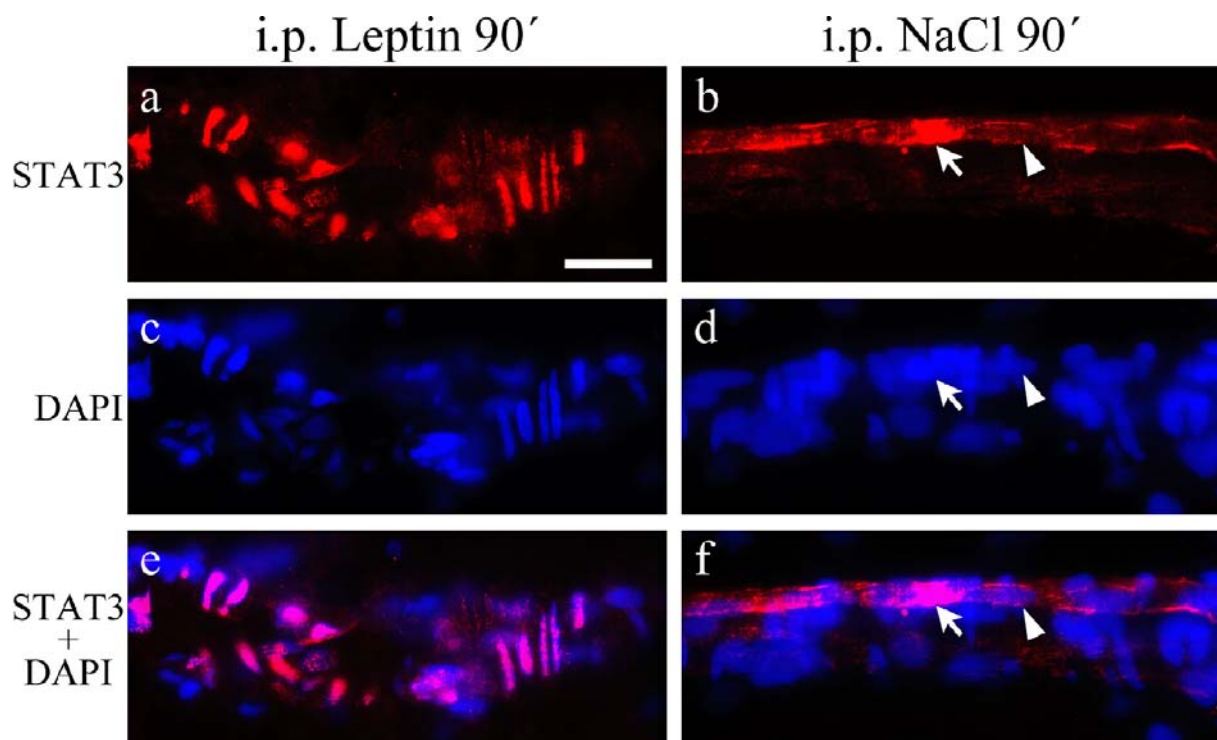


Abb. 27

Vergleich der STAT3-Immunreaktivität in Blutgefäßen des ZNS 90min nach i.p.-Applikation von Leptin (links) und NaCl (rechts). a: Rot markierte STAT3-positive Zellen in einem Blutgefäß. c: Derselbe Ausschnitt wie a, jedoch mit blau markierten Zellkernen. e: Überlagerung von a und c zum Nachweis nukleärer STAT3-Signale (pink) b: Zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität (rot). d: Derselbe Ausschnitt wie b, aber mit blau markierten Zellkernen. f: Überlagerung von b und d. Die pinkfarbene Struktur (Pfeil) ist nicht eindeutig als nukleäres Signal zu identifizieren, da hier eine Anhäufung von Zellen vorliegt (siehe Pfeil in Ausschnitt d). Die Pfeilköpfe in b, d und f deuten auf die selbe/n STAT3-negative/n Zelle/n bzw. Zellkern/e. Eichbalken für a, b, c, d, e und f = 25µm.

Bei den bislang in Abb. 25 und Abb. 26 gezeigten Zellen mit nukleären STAT3-Signalen konnte eine zweifelsfreie Zuordnung des Zelltyps so nicht getroffen werden. Dies schien für die in Abb. 27 und Abb. 28 gezeigten Zellen anders zu sein. Abb. 27 zeigt Blutgefäße aus der LH nach systemischer Leptingabe (links) bzw. nach systemischer NaCl-Applikation (rechts) bei einem Perfusionszeitpunkt von 90min. Dass es sich hier um Blutgefäße handelt, lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit allein durch die Morphologie und die spezifische Anordnung



der teilweise längsovalen Zellkerne (Abb. 27c und -d) vermuten. Die Abb. 27a und -b zeigen ein Blutgefäß in der Einfachmarkierung von STAT3. In Abb. 27a handelt es sich um rot markierte Endothelzellkerne (vergleiche mit Abb. 27e) wohingegen in Abb. 27b ausschließlich eine zytoplasmatische STAT3-Immunreaktivität vorkommt. Die Abb. 27c und -d zeigen den jeweils selben Ausschnitt von Abb. 27a bzw. -b, jedoch mit DAPI-markierten Zellkernen (blau). Zum Nachweis der nukleären Translokation von STAT3-Molekülen nach systemischer Leptingabe wurden die Abb. 27a und -c sowie -b und -d in -e bzw. -f übereinandergelagert. Nukleäre STAT3-Signale erscheinen pink. In Abb. 27e sieht man, dass alle Signale aus -a mit DAPI kolokalisiert und somit nukleären Ursprungs sind. In Blutgefäßen des ZNS eines systemisch NaCl-behandelten Tieres (Abb. 27f) war keine nukleäre STAT3-Translokation nachweisbar. Der Pfeilkopf weist in allen drei Ausschnitten (Abb. 27b, -d und -f) auf einen STAT3-negativen Zellkern. Der Pfeil deutet auf eine Anhäufung von Zellkernen, was in Abb. 27d gut zu sehen ist, so dass eine eindeutige Identifikation der STAT3-Expression durch die Übereinanderlagerung vieler Zellen nicht mehr möglich ist. Diese pinkfarbene Struktur kann somit nicht eindeutig als nukleäres Signal angesprochen werden.

Im nächsten Schritt wurden Zellen des PC der V<sub>1</sub> nach i.p.-Applikation von Leptin (Abb. 28a) gegenüber der NaCl-Applikation (Abb. 28b) verglichen. Auch in dieser Studie wurden STAT3- und DAPI-markierte Ausschnitte übereinandergelagert, um einen Nachweis über die nukleäre Herkunft der STAT3-Signale zu führen. Bei dem Leptin-behandelten Tier (Abb. 28a), welches 120min nach der Applikation perfundiert wurde, waren deutlich die nukleären STAT3-Signale (pink) zu sehen, wohingegen im NaCl-behandelten Tier (Abb. 28b), welches 60min *post injectionem* perfundiert wurde, keine nukleären aber zahlreiche zytoplasmatische STAT3-Signale (Pfeilköpfe) vorhanden waren. Da nur zum Zeitpunkt 60min sehr vereinzelt nukleäre STAT3-Signale in PC-Zellen nach NaCl-Behandlung auftraten (Tab. 17), konnte der Perfusionszeitpunkt 60min repräsentativ für alle Zeitpunkte bei den Kontrolltieren angesehen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach systemischer Gabe von Leptin eine spezifische nukleäre STAT3-Translokation in Zellen des ZNS gefunden wurde. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich dabei vor allem um Neurone, Endothelzellen und in geringem Maße um PC-Zellen. Der Nachweis über den neuronalen und endothelialen Ursprung dieser Leptin-induzierten STAT3-Translokation wird im folgenden Abschnitt geführt.

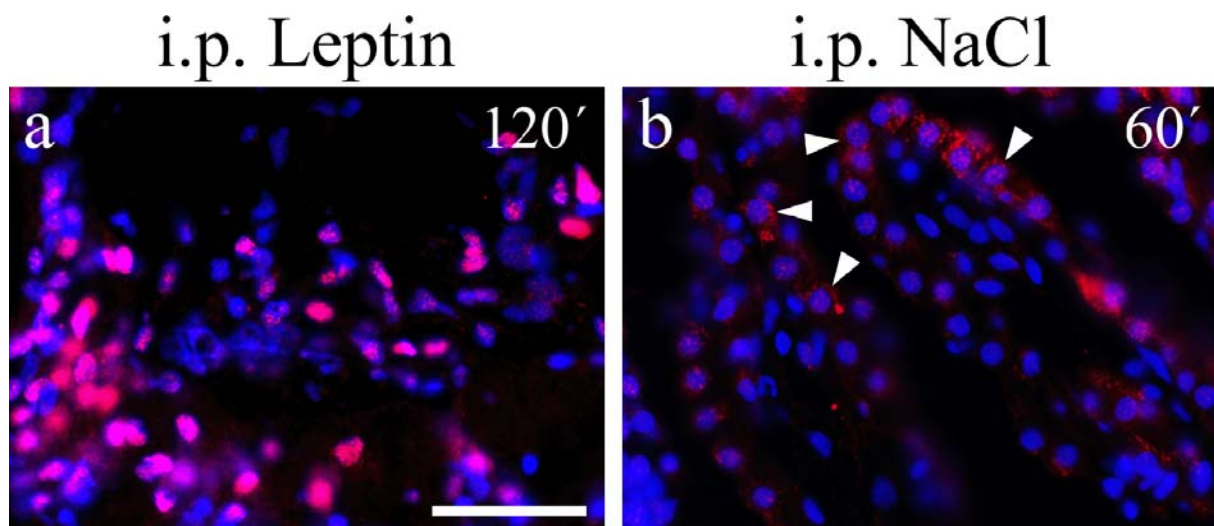


Abb. 28

Gegenüberstellung von Zellen des *Plexus choroideus* (PC) der *Ventriculi laterales* ( $V_l$ ) nach i.p.-Applikation von Leptin (a) und NaCl (b). Die Ausschnitte zeigen die Markierung von STAT3 (rot) und DAPI (blau). a: Ausschnitt des PC 120min *post injectionem*. Es sind zahlreiche nukleäre STAT3-Signale zu erkennen (pink). b: Ausschnitt eines PC 60min *post injectionem*. Es sind keine nukleären Signale detektiert. Die Pfeilköpfe deuten auf Zellen mit zytoplasmatischer STAT3-Immunreaktivität. Eichbalken für a und b = 50μm.

### 3.1.2. Neuroanatomischer Nachweis der STAT3-Translokation in unterschiedlichen Zelltypen des ZNS

#### 3.1.2.1. STAT3-Translokation in Neuronen

Für den Nachweis des neuronalen Ursprungs der in den hypothalamischen Kerngebieten gefundenen Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation wurden die Gehirnschnitte dreifachmarkiert. Die einzelnen Farbkanäle rot (STAT3-Immunreaktivität), blau (DAPI-Kernfärbung) und grün (Immunreaktivität für den neuronalen Zellmarker NeuN) wurden übereinandergelegt. Dadurch erschienen die nukleären neuronalen STAT3-Signale in einer gelben Farbe. In Abb. 29 wurde eine solche Kolo-kalisationsstudie für die RCH (Abb. 29a-f) und den ARC (Abb. 29g-m) eines systemisch Leptin-stimulierten Tieres mit einem Perfusionszeitpunkt von 90min durchgeführt. In Abb. 29a sieht man ein rotes STAT3-Signal einer Zelle (Pfeil). Abb. 29b zeigt denselben Ausschnitt wie Abb. 29a, jedoch mit NeuN-markierten Neuronen. Deutlich ist zu sehen, dass der Kern des Neurons, auf welches der Pfeil weist, intensiver gefärbt ist als das ihm umgebende Zytoplasma. Der dunklere Punkt im Zentrum des Kerns ist das Kernkörperchen (*Nucleolus*). Abb. 29c zeigt schließlich die blau markierten Kerne aller Zellen für denselben Ausschnitt der RCH wie Abb. 29a und -b. In der unteren Reihe (Abb. 29d, -e und -f) wurden die einzelnen Markierungen übereinandergelegt.

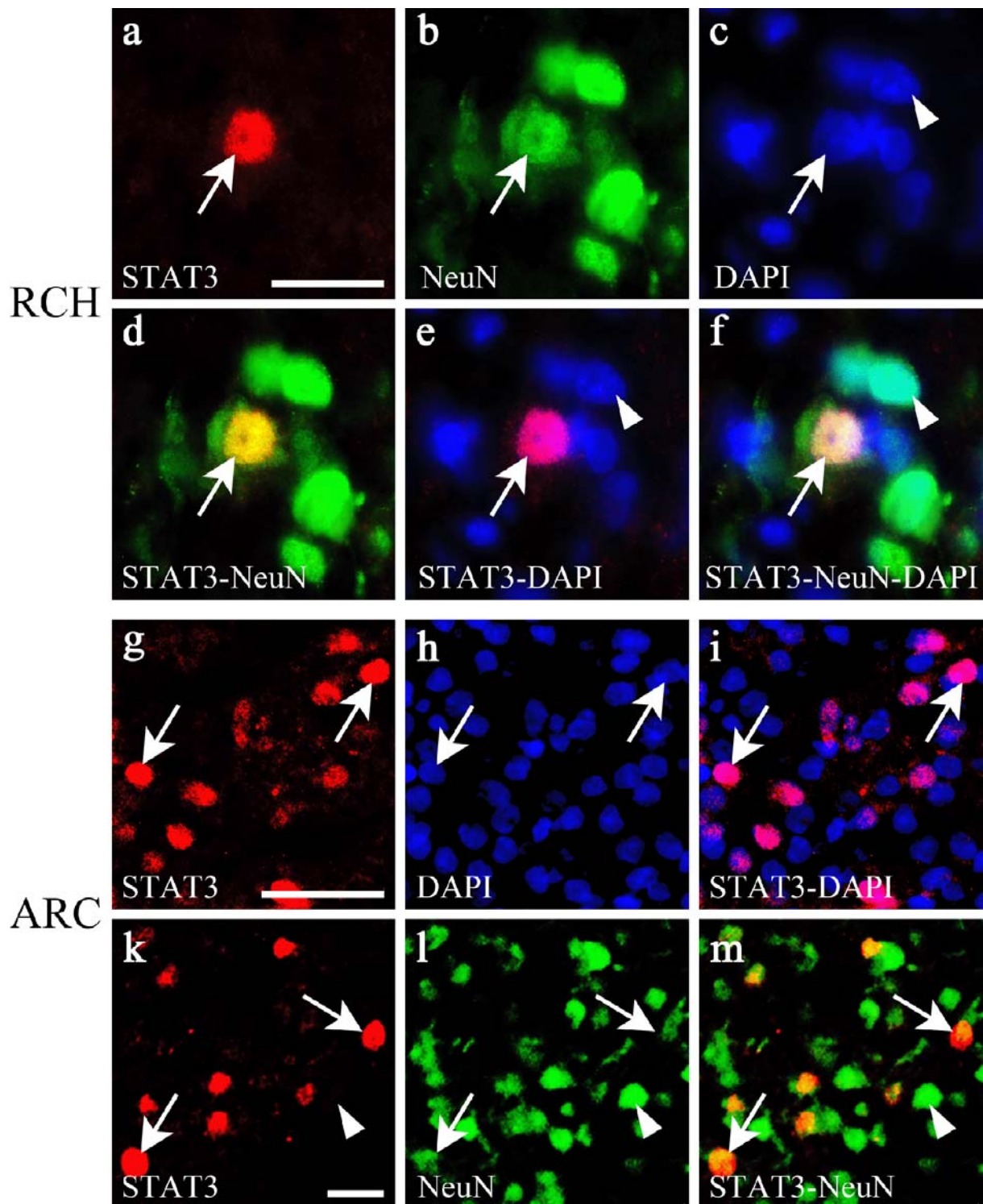


Abb. 29

Immunohistochemische Mehrfachmarkierung am Beispiel der RCH (a-f) und des ARC (g-m) zum Nachweis der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation in Neuronen. a: STAT3-positive Zelle in rot. b: Derselbe Ausschnitt wie a, aber mit NeuN-markierten Neuronen. c: Derselbe Ausschnitt wie a und b, aber mit DAPI-markierten Zellkernen. Der Pfeil weist auf die selbe Zelle wie der Pfeil in a bzw. b. d: Übereinanderlagerung von a und b, zum Nachweis der mit dem Pfeil markierten Zelle als Neuron. e: Übereinanderlagerung von a und c, zum Nachweis des mit dem Pfeil markierten STAT3-Signals als nukleäres Signal. f: Übereinanderlagerung von a, b und c, zum Nachweis des STAT3-Signals als nukleäres und neuronales Signal. Die Pfeilköpfe in c, e und f weisen auf einen STAT3-negativen Kern eines Neurons. g: Ausschnitt aus dem ARC mit rot markierten STAT3-Signalen (Pfeile). h: Derselbe Ausschnitt wie g, aber mit DAPI-markierten Kernen. i: Übereinanderlagerung von g und h zum Nachweis der STAT3-

**Signale als nukleäre Signale.** Die mit den Pfeilen markierten Kernsignale entsprechen denen in g und h. k: Abbildung eines anderen ARC-Ausschnittes mit rot markiertem STAT3 (Pfeile). l: Derselbe Ausschnitt wie k, aber mit grüner NeuN-Immunreaktivität in Neuronen. Die Pfeile weisen auf dieselben Zellen wie die Pfeile in k. m: Übereinanderlagerung von k und l zum Nachweis des neuronalen Ursprungs der STAT3-Signale (Pfeile). Die Pfeilköpfe in k, l und m weisen auf ein STAT3-negatives Neuron. Eichbalken für a-f = 25µm und für g-m = 50µm. Für h und i gilt der Eichbalken in g und für l und m gilt der Eichbalken in k.

Abb. 29d zeigt den Ausschnitt -a mit -b und dient dem Beweis des neuronalen Ursprungs des STAT3-Signals aus -a (Pfeil). Abb. 29e zeigt die Übereinanderlagerung von -a und -c und beweist, dass das STAT3-Signal aus -a nukleären Ursprungs ist. Durch die Übereinanderlagerung von Abb. 29a, -b und -c kommt der Ausschnitt -f zustande. Hier ist deutlich zu sehen, dass das STAT3-Signal aus Abb. 29a mit dem Kern eines Neurons kolokalisiert ist (Pfeil). Die Pfeilköpfe in Abb. 29c, -e und -f weisen alle auf denselben STAT3-negativen Kern eines Neurons.

Die untere Hälfte von Abb. 29 zeigt eine Kolokalisationsstudie am Beispiel des ARC. Abb. 29g zeigt mehrere rote STAT3-positive Zellen in dieser Struktur (Pfeile). Die Kerne aller Zellen in Abb. 29g sind in -h mit der DAPI-Färbung blau markiert. Durch die Übereinanderlagerung von -g und -h kommt schließlich der Ausschnitt -i zustande. Alle STAT3-Signale, die mit einem blau gefärbten Kern kolokalisiert sind, erscheinen pinkfarben. Diese STAT3-Signale im ARC sind nukleären Ursprungs. Die Pfeile markieren dieselben repräsentativen STAT3-positiven Zellkerne wie die Pfeile in Abb. 29g und -h. In der unteren Reihe (Abb. 29k, -l und -m) ist ein anderer Ausschnitt aus dem ARC eines Leptin-stimulierten Tieres gezeigt. Die roten Signale in Abb. 29k sind STAT3 positive Zellen (Pfeile). Dieselben Zellen sind in Abb. 29l ebenso durch NeuN-Immunreaktivität grün markiert und damit neuronalen Ursprungs. Die Übereinanderlagerung von Abb. 29k und -l führt zum Ausschnitt -m. Hier sind alle STAT3-positiven Neurone durch die gelbe Farbe zu erkennen (Pfeile). Der Pfeilkopf deutet auf ein Neuron, das STAT3-negativ ist.

Der Beweis des neuronalen Ursprungs der Leptin-induzierten STAT3-Translokation konnte auch in weiteren hypothalamischen Kerngebieten geführt werden (Abb. 30). Die Ausschnitte des DMH (Abb. 30a, -b, -c und -d), des VMH (-e, -f und -g), der RCH (-k) und des PMV (-l, -m und -n) stammen aus einem 90min Leptin-stimulierten Tier. Dagegen wurde der RCH-Ausschnitt (Abb. 30h) von einem Tier 60min und Abb. 30i 30min nach Leptingabe ausgewählt. Abb. 30a ist eine Übersicht vom caudobasalen *Hypothalamus* in etwa auf Höhe -2,8mm von Bregma. Die roten Signale in den Strukturen ARC, PAA, VMH und DMH markieren eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Immunreaktivität. Abb. 30b zeigt in einer höheren Auflösung einen anderen Ausschnitt aus dem DMH mit nukleären STAT3-Signalen.



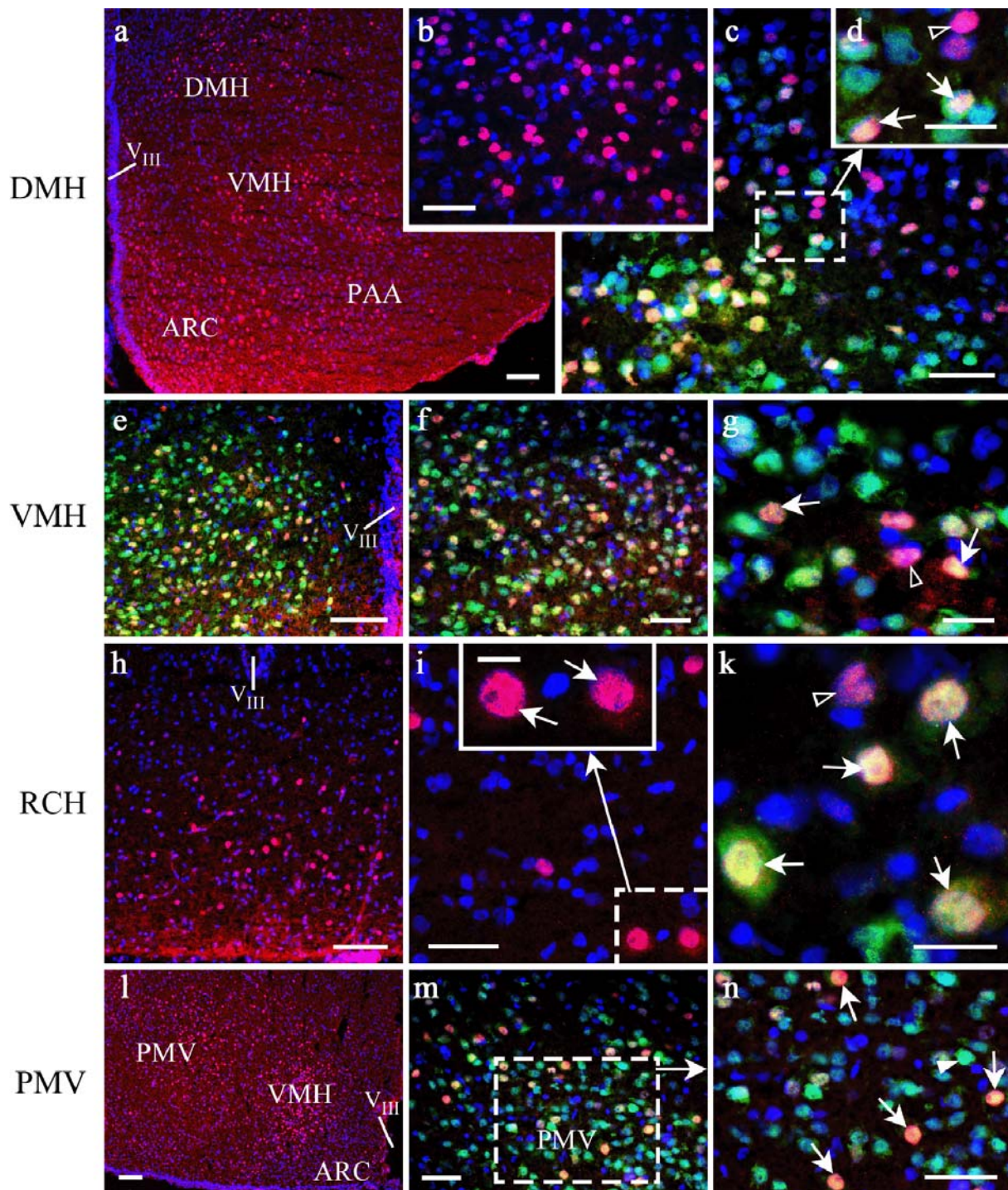


Abb. 30

Auswahl einiger hypothalamischer Kerngebiete mit Leptin-induzierter nukleärer STAT3-Immunreaktivität und Nachweis des neuronalen Ursprungs durch immunhistochemische Dreifachmarkierung (STAT3, NeuN, DAPI). a: Übersicht des caudobasalen *Hypothalamus* (ca. Bregma  $-2,8\text{mm}$ ) mit zahlreichen STAT3-Signalen (rote Punkte). b: Doppelmarkierung zum Nachweis des nukleären Ursprungs der STAT3-Signale im DMH (pink). c und d: Ausschnitt aus dem DMH mit Dreifachmarkierung. Die Pfeile weisen auf neuronale, STAT3-positive Zellkerne. Der Pfeilkopf zeigt auf eine nicht-neuronale STAT3-positive Zelle. e, f und g: Ausschnitte aus dem VMH mit Dreifachmarkierung. Die Pfeile in g weisen auf STAT3-positive Kerne von Neuronen. Der Pfeilkopf zeigt auf eine nicht-neuronale STAT3-positive Zelle. h und i: Ausschnitte der RCH mit nukleären STAT3-Signalen. Das Inset in i hebt zwei dieser Signale deutlich hervor. k: Ausschnitt der RCH mit Dreifachmarkierung. Die Pfeile deuten auf STAT3-positive neuronale Kerne. Der Pfeilkopf zeigt auf eine STAT3-positive Zelle, die kein Neuron ist. l: Übersicht des caudobasalen *Hypothalamus* (ca. Bregma  $-4,16\text{mm}$ ) mit zahlreichen nukleären

**STAT3-Signalen (pink). m und n: Ausschnitte des PMV mit Dreifachmarkierung. Die Pfeile deuten auf STAT3-positive Kerne neuronalen Ursprungs. Der Pfeilkopf hingegen weist auf ein STAT3-negatives Neuron. Eichbalken für a, e, h und l = 100µm, für b, c, f, i, m und n = 50µm, für d, g, k und das Inset in i = 25µm.**

Abb. 30c zeigt einen weiteren Anschnitt des DMH mit der Dreifachmarkierung (STAT3, DAPI und NeuN). Die gelben Punkte signalisieren eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation in Neuronen und sind in Abb. 30d in einer höheren Auflösung verdeutlicht. Die Pfeile weisen auf neuronale STAT3-positive Kerne, wohingegen der Pfeilkopf auf ein STAT3-negatives Neuron zeigt. Diese Zelle kann durch die NeuN-Markierung nicht eindeutig identifiziert werden. Der neuronale Ursprung der nukleären STAT3-Signale im VMH ist in Abb. 30e, -f und -g nachgewiesen. Zwischen den vielen grün markierten Neuronen lassen sich zahlreiche gelbe Punkte erkennen, die eine nukleäre STAT3-Translokation in Neuronen signalisieren. Dies zeigt Abb. 30g in hoher Auflösung. Die Pfeile markieren gelbe STAT3-positive Zellkerne in Neuronen. Der Pfeilkopf weist auf eine STAT3-negative Zelle. Ähnliches war in der RCH, wie schon in Abb. 29f gezeigt, zu finden. Abb. 30h zeigt eine Übersicht der RCH in einer Doppelmarkierung von STAT3 und DAPI. Am oberen Bildrand befindet sich der Boden des V<sub>III</sub>. Deutlich lassen sich die roten nukleären STAT3-Signale in den relativ großen Zellen erkennen, was in Abb. 30i und -k in einer höheren Auflösung verdeutlicht wird. Die intensiven STAT3-Signale (-i) sind mit der blauen DAPI-Färbung der Zellkerne (Pfeile) kolokalisiert. In Abb. 30k sind mehrere große STAT3-positive Zellkerne von Neuronen (Pfeile) abgebildet. Der Pfeil am linken Bildrand deutet auf den Zellkern eines Neurons, in welchem die rote Farbe der STAT3-Immunreaktivität nahezu hinter der intensiv grünen NeuN-Markierung verschwindet. Im Gegensatz dazu zeigt der Pfeilkopf auf ein Neuron, welches schwach grün gefärbt ist. An diesem Beispiel soll deutlich werden, dass eine Typisierung der Zellen mittels NeuN-Markierung problematisch war. Die Intensität der grünen Immunreaktivität in einigen hypothalamischen Kerngebieten (besonders auch im ARC) fiel oft sehr unterschiedlich aus (3.2.2.3.1.). Der Beweis des neuronalen Ursprungs der nukleären STAT3-Signale im PMV wird in Abb. 30l, -m und -n geführt, wobei -l einen Überblick über den *Hypothalamus* in etwa auf Höhe -4,16mm von Bregma gibt. Angeschnitten wurden hier die Kerngebiete PMV, VMH sowie der caudale Anteil des ARC. In den Kerngebieten PMV und VMH waren in hoher Dichte nukleäre STAT3-Signale (rot) vertreten. Speziell für den PMV zeigen die Abb. 30m und -n in einer hohen Auflösung die Dreifachmarkierung von STAT3, DAPI und NeuN. Abb. 30n ist ein Detailausschnitt von dem in -m gestrichelt-hervorgehobenen Bereich. Die Pfeile deuten auf STAT3-positive Zellkerne

von Neuronen mit eindeutig gelber Farbe. Der Pfeilkopf zeigt auf ein STAT3-negatives Neuron.

### 3.1.2.2. STAT3-Translokation in Endothelzellen

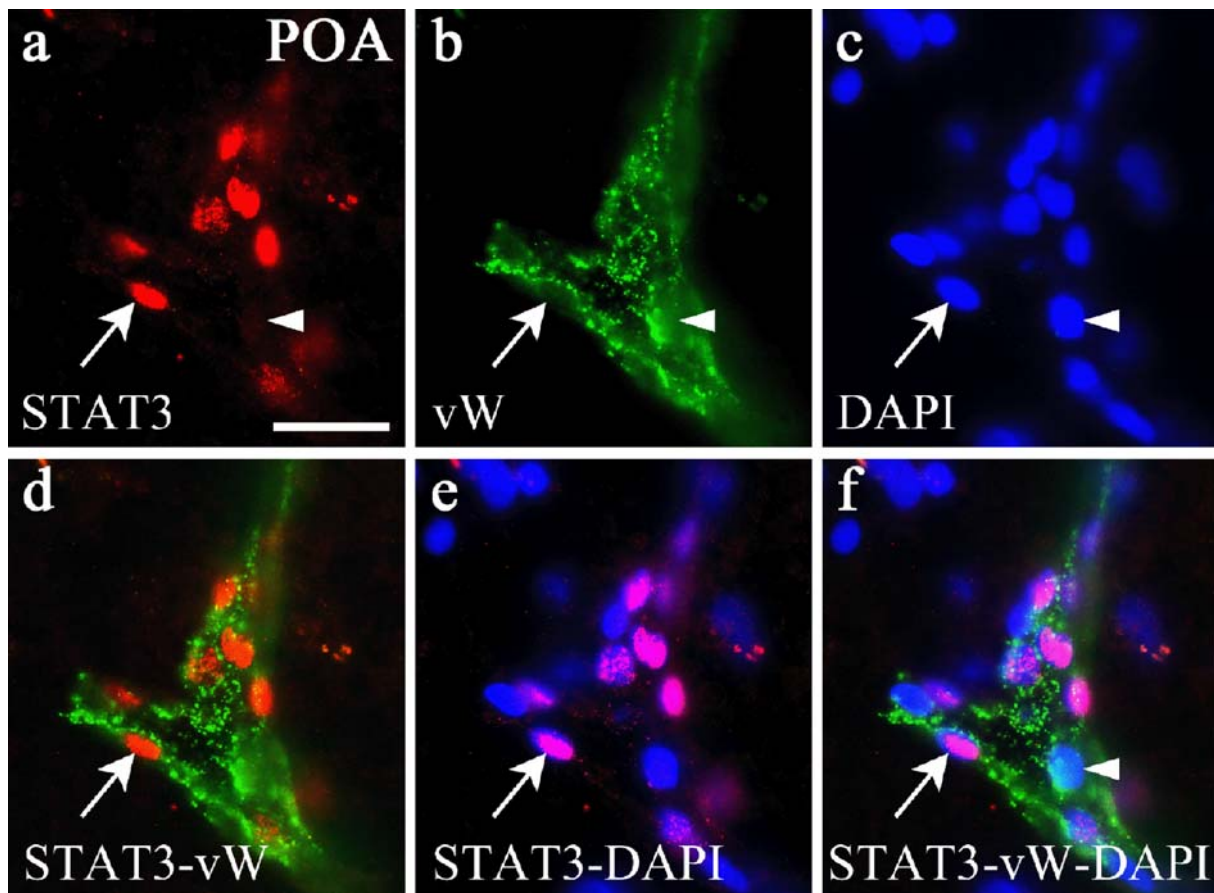


Abb. 31

Darstellung der immunhistochemischen Dreifachmarkierung am Beispiel der *Area praeoptica* (POA) (a-f) zum Nachweis der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation in Endothelzellen nach i.p.-Applikation. a: Blutgefäß mit roten STAT3-positiven Zellen (Pfeil). b: Dieselbe Abbildung wie a, aber mit vW-Faktor-markierten Endothelzellen. c: Derselbe Ausschnitt wie a und b, aber mit DAPI-markierten Zellkernen. Der Pfeil weist auf denselben Kern wie die Pfeile in a und b. d: Übereinanderlagerung von a und b, zum Nachweis der mit dem Pfeil markierten Zelle als Endothelzelle. e: Übereinanderlagerung von a und c zum Nachweis des mit dem Pfeil markierten STAT3-Signals als nukleäres Signal. f: Übereinanderlagerung von a, b und c, zum Nachweis desselben STAT3-Signals als nukleäres endotheliales Signal. Die Pfeilköpfe in a, b, c, und f weisen auf einen STAT3-negativen Kern einer Endothelzelle. Eichbalken für a-f = 25µm.

In einem nächsten Schritt wurde der mögliche endotheliale Ursprung der STAT3-Translokation in Blutgefäßen untersucht. Die Kolokalisationsstudie wurde in Abb. 31 am Beispiel eines Blutgefäßes aus der POA einer 60min nach der systemischen Applikation von Leptin perfundierten Ratte durchgeführt. Abb. 31a zeigt die Detektion der STAT3-Immunreaktivität in rot (Pfeil), wohingegen Abb. 31b denselben Ausschnitt wie -a, jedoch mit



dem grün gefärbten vW-Faktor, einem im Zytoplasma von Endothelzellen lokalisierten Protein, zeigt. Schließlich ist Abb. 31c wiederum derselbe Ausschnitt wie -a und -b, aber mit blau gefärbten Kernen (DAPI) aller Zellen. Die Übereinanderlagerung von Abb. 31a und -b ist in Abb. 31d gezeigt, in welchem die Kolokalisation der STAT3-Signale mit dem vW-Faktor dargestellt ist. Die roten STAT3-Signale sind von grüner Immunreaktivität umgeben. Abb. 31e stellt die Übereinanderlagerung des Ausschnitts -a und -c dar, hier sind alle STAT3-Signale mit den blauen Kernen kolokalisiert (pink). Abb. 31f ist die Übereinanderlagerung von allen drei Ausschnitten (Abb. 31a, -b und -c). Hiermit wurde bewiesen, dass Kerne von Endothelzellen Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation zeigten. Die Pfeile in Abb. 31a-f deuten alle auf denselben STAT3-positiven Kern einer Endothelzelle, wohingegen die Pfeilköpfe in Abb. 31b, -c und -f denselben STAT3-negativen Kern einer anderen Endothelzelle markieren. Dieser am Beispiel eines Blutgefäßes aus der POA gezeigte Befund konnte auch für andere Blutgefäße in den verschiedensten ZNS-Regionen und Kerngebieten des gesamten Rattengehirns erhoben werden.

In Abb. 32 wurden einige solcher Blutgefäße aus unterschiedlichsten Hirnregionen nach systemischer Leptingabe zusammengestellt. Der Ausschnitt eines Blutgefäßes aus der LH (Abb. 32a und -b) stammt aus einem 90min *post injectionem* perfundierten Tier. Abb. 32b ist ein Ausschnitt aus -a und zeigt in hoher Auflösung die Kolokalisation der roten STAT3-Signale mit den blauen DAPI-markierten Zellkernen (Pfeil). Die mittlere Reihe (Abb. 32c-g) zeigt eine Kolokalisationsstudie an einem Gefäß aus dem *Cortex cerebri*. Die Ratte wurde 90min nach der Leptin-Stimulation perfundiert. Die Pfeile deuten auf zwei STAT3-positive Zellkerne zweier Endothelzellen. Die pinkfarbenen Kerne sind von grüner vW-Faktor-Immunreaktivität umgeben, was den endothelialen Ursprung dieser nukleären Signale beweist. Im Gegensatz dazu deuten die Pfeilköpfe auf einen STAT3-negativen Kern einer Endothelzelle. Abb. 32h zeigt STAT3-positive Zellkerne (pink) in einem Blutgefäß aus dem *Hippocampus* 90min nach systemischer Leptin-Stimulation. Das Gleiche ließ sich für ein Blutgefäß aus der *Decussatio supraoptici* (sox, Abb. 32i) 120min sowie für ein Blutgefäß aus dem *Caudate putamen* (CPU, Abb. 32k) 90min nach systemischer Leptin-Applikation zeigen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Endothelzellen aus dem ZNS der Ratte nach systemischer Stimulation Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Signale exprimierten. Dennoch reagierten bei weitem nicht alle Endothelzellen mit einer STAT3-Antwort. Über das gesamte Gehirn verteilt nur vereinzelte Blutgefäße STAT3 positiv. Bei den Kontrolltieren jedoch konnten zu keinem Zeitpunkt STAT3-positive Endothelzellen detektiert werden.



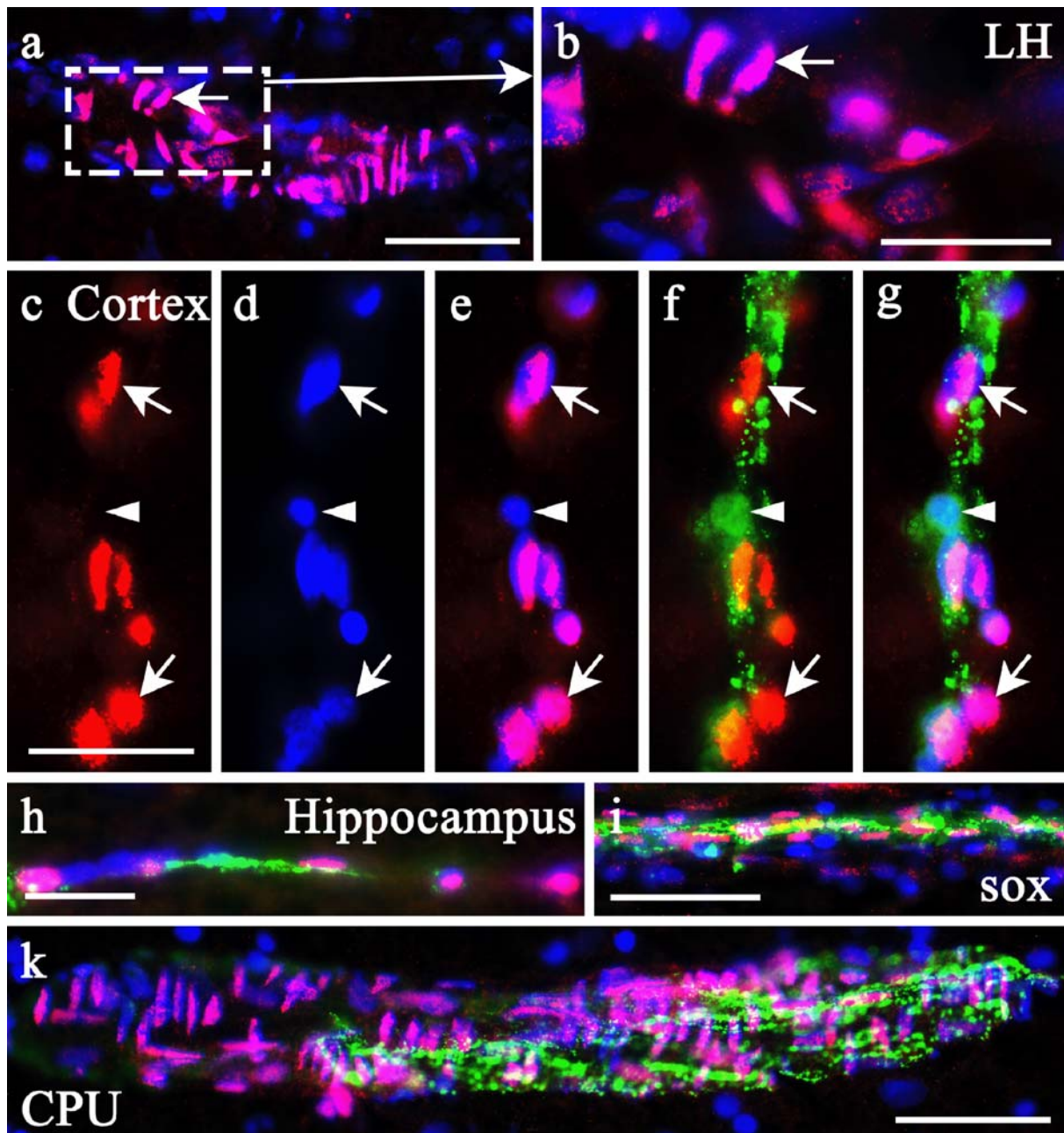
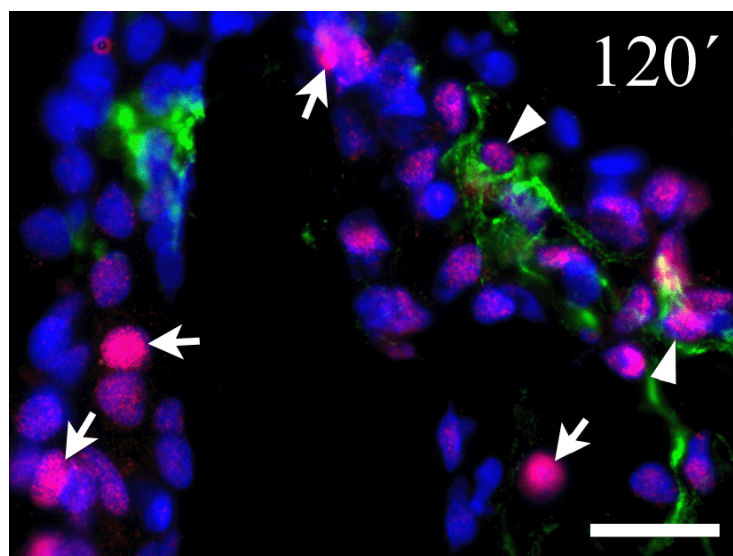


Abb. 32

Beispiele einiger Blutgefäße im ZNS mit Leptin-induzierter nukleärer STAT3-Immunreaktivität in Endothelzellen. a: Abbildung eines Blutgefäßes aus der LH mit vielen STAT3-positiven Endothelzellen (pink). Der Nachweis der nukleären STAT3-Translokation ist mit der DAPI-Färbung (blau) geführt. b: Detailaufnahme von a. Der Pfeil weist auf ein nukleäres STAT3-Signal in einer Endothelzelle. c, d, e, f und g: Kolokalisationsstudie eines Blutgefäßes aus dem *Cortex cerebri*. c: STAT3-markierte Endothelzellen (rot). d: Derselbe Ausschnitt wie c, aber mit DAPI-gefärbten Zellkernen. e: Übereinanderlagerung von c und d zum Nachweis der nukleären Translokation von STAT3 (pink). f: Derselbe Ausschnitt wie a mit zusätzlicher Markierung des vW-Faktors (grün) zum Nachweis der nukleären STAT3-Signale mit endothelialeem Ursprung. g: Dreifachmarkierung (STAT3, vW, DAPI) desselben Ausschnittes wie a. Die Pfeile deuten auf STAT3-positive Kerne von Endothelzellen. Der Pfeilkopf weist auf eine STAT3-negative Endothelzelle. h, i und k: Dreifachmarkierungsstudien an Blutgefäßen aus dem *Hippocampus*, der *Decussatio supraoptica* (sox) und dem *Caudate putamen* (CPU) mit Leptin-induzierter nukleärer STAT3-Translokation in Endothelzellkernen (pink). Eichbalken für b-h = 25µm und für a, i und k = 50µm. Für d-g gilt der Eichbalken in c.

### 3.1.2.3. *STAT3-Translokation in Zellen des Plexus choroideus (PC)*

Wie in Abb. 28a und -b bereits gezeigt, wurden auch Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Signale in Zellen des PC der  $V_1$  gefunden. Der direkte Beweis für den zellulären Ursprung dieser STAT3-positiven Zellen stand aber noch aus. Zu diesem Zweck wurde die immunhistochemische Dreifachmarkierung von STAT3, DAPI und vW-Faktor genutzt. In Abb. 33 sind die nukleären STAT3-Signale (pink) in Zellen des PC einer Ratte zu sehen, die 120min nach ihrer systemischen Leptin-Stimulation perfundiert wurde. Die Pfeile deuten auf STAT3-positive Zellen, die nicht mit dem endothelialen vW-Faktor (grün) kolokalisiert sind. Diese STAT3-positiven Zellen mit starker Immunreaktivität schienen damit keine Endothelzellen zu sein. Im Gegensatz dazu weisen die Pfeilköpfe auf Zellkerne die schwach STAT3 exprimieren und mit der vW-Immunreaktivität kolokalisiert sind. Diese Zellen schienen endothelialer Natur zu sein. Somit kamen im PC neben STAT3-exprimierenden Endothelzellen auch andere STAT3-positive Zellen unbekannten Typs vor.



**Abb. 33**

**Immunhistochemische Dreifachmarkierung (STAT3, vW, DAPI) des PC der  $V_1$  von i.p.-Leptin-stimulierten Ratten bei einem Perfusionszeitpunkt von 120min. Die Pfeile deuten auf STAT3-positive Zellkerne (pink) mit starker Immunreaktivität, die nicht mit dem vW-Faktor kolokalisiert und somit keine Kerne von Endothelzellen sind. Die Pfeilköpfe weisen auf Zellkerne endothelialen Ursprungs mit schwacher STAT3-Immunreaktivität. Eichbalken = 25µm.**

### 3.2. Nachweis des Transkriptionsfaktors STAT5

#### 3.2.1. Zentrale Stimulation (i.c.v.)

##### 3.2.1.1. Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT5-Translokation

Um die STAT5-Expression nach zentraler Leptin-Stimulation (3,5µg/Tier, n = 6) mit der nach zentraler Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung (n = 5) vergleichen zu können, wurden die Gehirnschnitte nach unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten mittels der DAB-Färbung ausgewertet (2.8.3.2.). Dabei wurde insbesondere auf die Verteilung der Leptin-induzierten, nukleären STAT5-Translokation in für die Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts relevanten Kerngebieten des *Hypothalamus* und des Hirnstamms geachtet. Dazu wurde eine tabellarische Übersicht erstellt, die einen direkten Vergleich zwischen der Leptin- und der NaCl-induzierten nukleären STAT5-Immunreaktivität zulässt (Tab. 18). Zu diesem Zweck wurden die STAT5-Signale semi-quantitativ mittels eines fünf-Punkte-Bewertungssystems (+++ = hohe Signaldichte, ++ = mittlere Signaldichte, + = niedrige Signaldichte, ± = nur vereinzelte und – = keine nukleären Signale) bewertet. Durch den Vergleich mit den Kontrolltieren ließ sich eine spezifische Leptin-induzierte STAT5-Translokation ermitteln. Bei der neuroanatomischen Auswertung fiel zunächst auf, dass die nukleäre STAT5-Translokation fast ausschließlich zum Zeitpunkt 30min nach i.c.v.-Applikation auftrat. In den Leptin-behandelten Tieren traten nukleäre STAT5-Signale in einer hohen Dichte im PaV und im Pe auf. Im Kontrolltier waren jedoch in diesen beiden Kerngebieten ebenfalls Signale in einer mittleren Dichte vertreten. Im SO kamen nukleäre Signale, die in den Kontrolltieren nicht anzutreffen waren, in einer mittleren Dichte vor. Ebenfalls traten Unterschiede im PMV und im *Nucleus praeopticus magnocellularis* (MCPO) auf. Nach zentraler Leptingabe traten dort nukleäre STAT5-Signale nur vereinzelt oder in geringer Dichte auf, wohingegen nach zentraler NaCl-Gabe nur vereinzelte Signale im MCPO und keine Signale im PMV zu verzeichnen waren. In allen anderen Strukturen waren keine Unterschiede feststellbar. Es sei darauf hingewiesen, dass, sofern möglich, zur Bestimmung der Signaldichte nukleärer STAT5-Immunreaktivität die Werte der einzelnen Tiere zu den jeweiligen Perfusionszeitpunkten arithmetisch gemittelt wurde.

**i.c.v.-Applikation**

|  | 30'                   |                     | 60'                   | 120'                  |                     |
|--|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
|  | Leptin<br><i>n</i> =2 | NaCl<br><i>n</i> =4 | Leptin<br><i>n</i> =2 | Leptin<br><i>n</i> =2 | NaCl<br><i>n</i> =1 |
| <b>Hypothalamische Strukturen</b>          |                       |                     |                       |                       |                     |
| Area laterale hypothalami (LH)             | ++                    | ++                  | –                     | –                     | –                   |
| Area periarquata (PAA)                     | ±                     | ±                   | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus arcuatus (ARC)                     | ++                    | ++                  | +                     | +                     | –                   |
| Nucleus hypothalamicus dorsomedialis (DMH) | +                     | +                   | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus paraventricularis (PaV)            | +++                   | ++                  | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus periventricularis (Pe)             | +++                   | ++                  | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus praemamillaris ventralis (PMV)     | +                     | –                   | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus praeopticus magnocellularis (MCPO) | +                     | ±                   | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus supraopticus (SO)                  | ++                    | –                   | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus tuberomamillaris (TM)              | ++                    | ++                  | –                     | –                     | –                   |
|  |                       |                     |                       |                       |                     |
| <b>Medulla oblongata</b>                   |                       |                     |                       |                       |                     |
| Nucleus raphe obscurus (ROb)               | ++                    | ++                  | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus raphe pallidus (RPa)               | ++                    | ++                  | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus tractus solitarius (Sol)           | +                     | +                   | –                     | –                     | –                   |
| Nucleus dorsomotorius nervi vagus (MNV)    | ++                    | ++                  | –                     | –                     | –                   |
|  |                       |                     |                       |                       |                     |
| <b>Andere Zelltypen</b>                    |                       |                     |                       |                       |                     |
| Plexus choroideus (PC)                     | ±                     | ±                   | –                     | –                     | –                   |
| Cellulae endotheliales                     | +                     | +                   | –                     | –                     | –                   |
| Cellulae ependymales                       | ±                     | ±                   | –                     | –                     | –                   |
| Cellulae meningeales                       | ±                     | ±                   | –                     | –                     | –                   |

**Tab. 18**

**Semi-quantitative Auswertung (arithmetisch gemittelt) der Signaldichte nukleärer STAT5-Immunreaktivität nach zentraler Leptingabe im Vergleich zu den Kontrolltieren nach unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten (30, 60 und 120min). Die Signalhäufigkeit wurde mittels eines fünf-Punkte-Bewertungsschemas ermittelt: +++ = hohe Signaldichte, ++ = mittlere Signaldichte, + = niedrige Signaldichte, ± = nur vereinzelte und – = keine nukleären Signale. Die Grundlage für die Nomenklatur der Kerngebiete und Strukturen bildete der Rattengehirnatlas (Paxinos and Watson 1998).**

Neben der tabellarischen Auswertung sollten die Unterschiede zwischen den Tieren mit zentraler Leptin-Behandlung und denen nach NaCl-Applikation in mikroskopischen Bildtafeln (Abb. 34 und Abb. 35) verdeutlicht werden. Die STAT5-Immunreaktivität, die anhand der braunen DAB-Färbung zu erkennen war (2.8.3.2.), war 30min nach der Stimulation in dem V<sub>III</sub>-umgebenden ARC des Kontrolltieres (rechts) fast genau so hoch wie nach Leptin-Applikation (links, Abb. 34). Abb. 34a und -b zeigen jeweils eine Übersicht über den ARC in etwa auf Höhe –3,14mm von Bregma. Die Verteilung der STAT5-positiven Zellkerne (braune Immunreaktivität, schwarze Pfeile) begrenzte sich bei beiden Tieren fast ausschließlich auf den dorsalen Anteil des ARC (ARC-D).



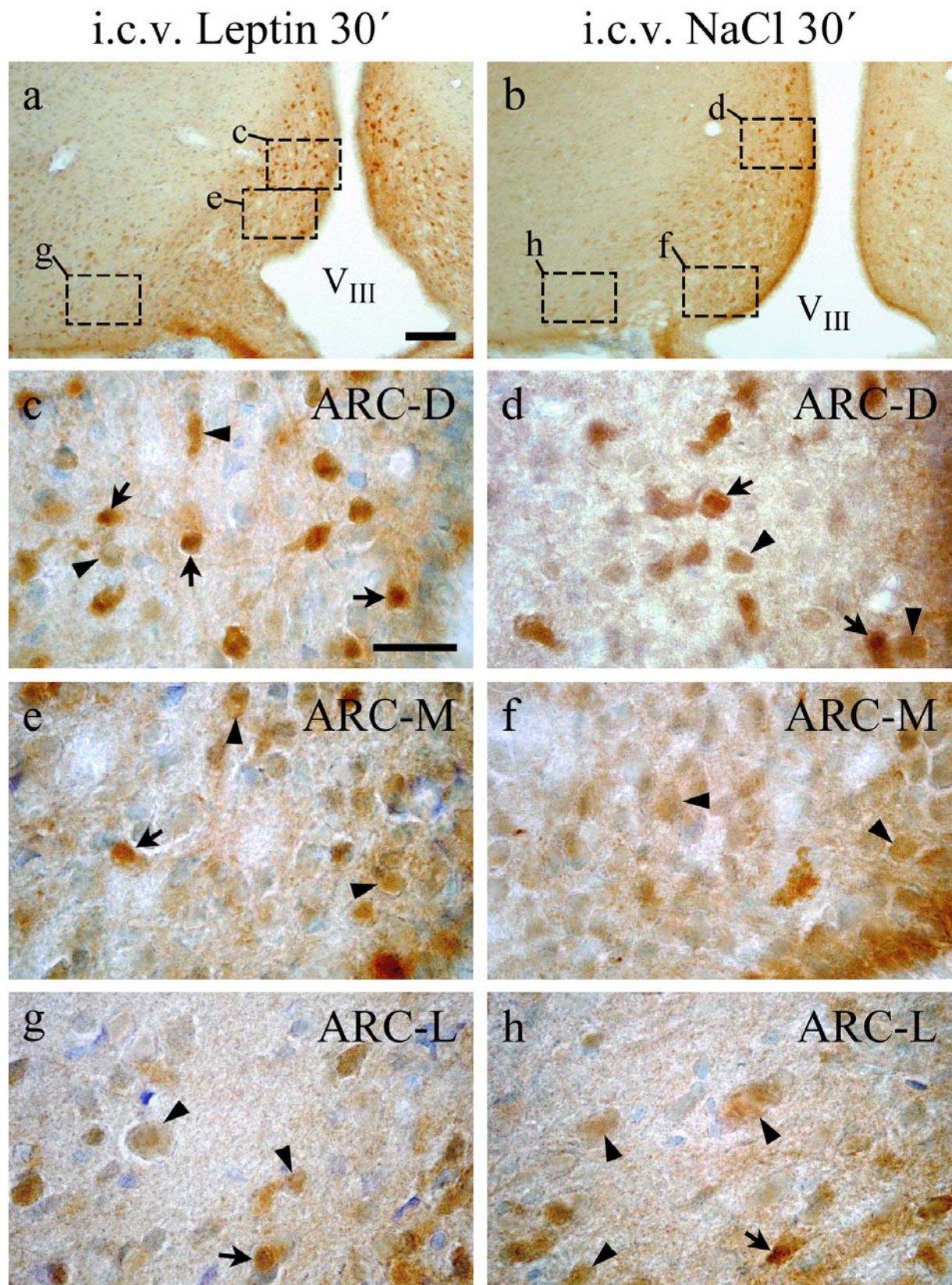


Abb. 34

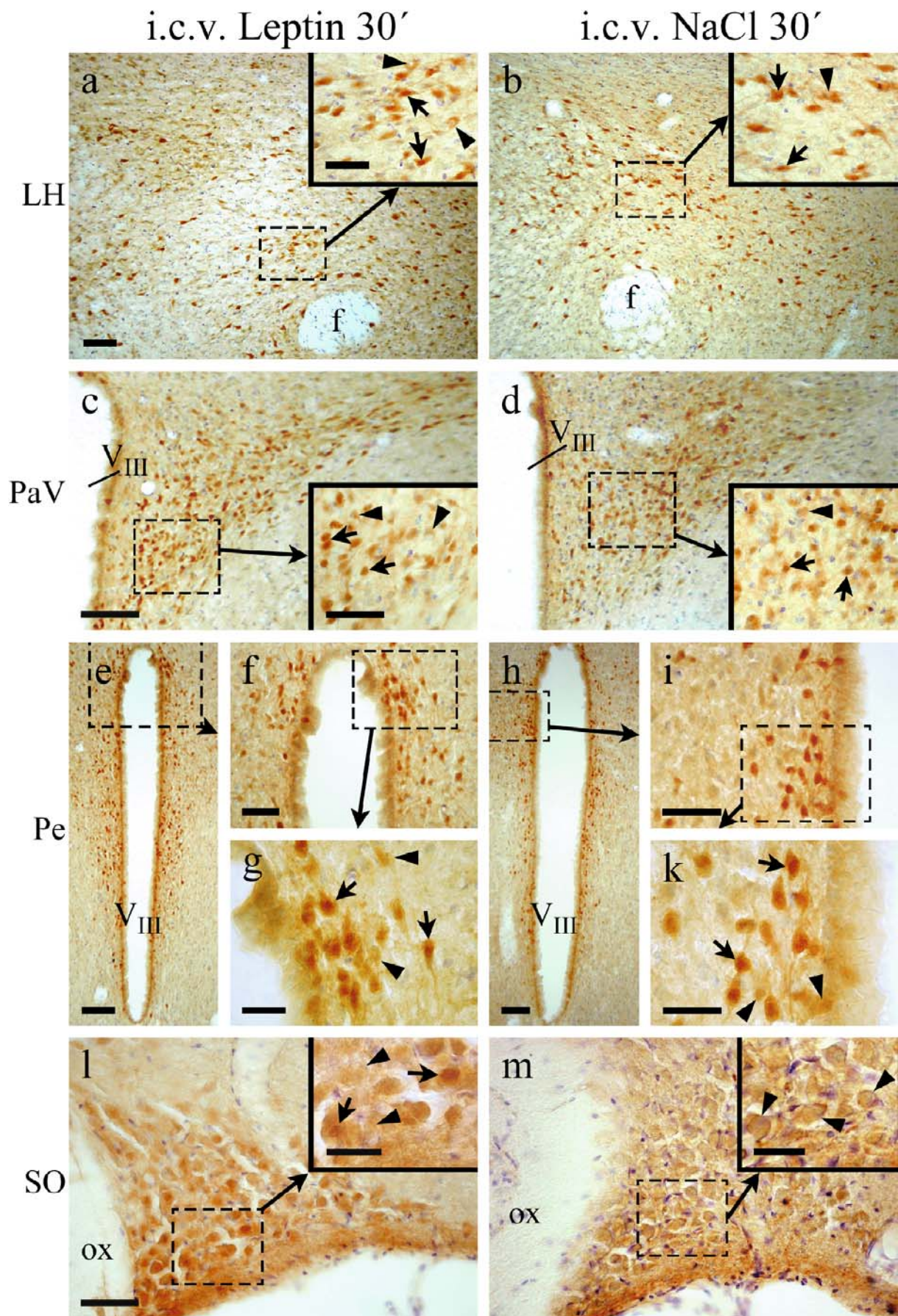
Vergleich der STAT5-Signale im ARC auf Höhe  $-3,14$  mm von Bregma einer i.c.v. Leptin-stimulierten Ratte (links) und eines Kontrolltieres (rechts), die 30 min nach der Applikation perfundiert wurden. Die STAT5-Detektion wurde mit der Einfachmarkierung (DAB) durchgeführt. a und b: Übersichtsaufnahmen des ARC mit seinen drei Anteilen (dorsal = D, medial = M und lateral = L), aus denen je ein Bereich vergrößert wurde (c, e und g bzw. d, f und h). Die nukleäre STAT5-Immunreaktivität (braune Punkte) konzentrierte sich hauptsächlich im

**ARC-D in a und b in einer mittleren Dichte. c-h: Detailaufnahmen der jeweiligen markierten Bereiche aus a bzw. aus b. Im Ausschnitt c und d (ARC-D) sind zahlreiche nukleäre STAT5-Signale (Pfeile), aber nur wenige zytoplasmatische Signale (Pfeilköpfe) zu sehen. Im ARC-M (e und f) sowie im ARC-L (g und h) sind nur noch vereinzelte nukleäre (Pfeile) jedoch viele zytoplasmatische Signale (Pfeilköpfe) erkennbar. Eichbalken für a und b = 100µm und für c-h = 25µm.**

Wie in Abb. 34c bis -h in einer höheren Auflösung verdeutlicht wird, sind im ARC-D (Abb. 34c und -d) überwiegend nukleäre, durch Pfeile markierte, und im ARC-M (Abb. 34e und -f) und ARC-L (Abb. 34g und -h) vor allem zytoplasmatische Signale (Pfeilköpfe) vertreten. Hier kamen nur noch vereinzelte nukleäre STAT5-Signale vor.

In der LH, dem PaV, dem Pe und dem SO sind die Differenzen zwischen Leptin- und NaCl-induzierter STAT5-Translokation in Abb. 35 bildlich dargestellt. Abb. 35a und -b zeigen eine LH mit vielen DAB-gefärbten Zellen (braun) in unmittelbarer Nähe der *Fornix* (f). Die hohe Auflösung der Insets zeigen den nukleären Ursprung dieser Signale (Pfeile). Im Kontrolltier (Abb. 35b) war die nukleäre STAT5-Translokation ebenso ausgeprägt wie im Leptin-stimulierten Tier. Zytoplasmatische Signale (Pfeilköpfe) kamen in der LH nur vereinzelt vor. Ähnliches zeigte sich bei der Verteilung STAT5-positiver Zellen im PaV (Abb. 35c und -d). Die DAB-gefärbten Zellen waren in einer mittleren (NaCl-Behandlung) bis hohen Dichte (Leptin-Behandlung) vor allem im parvozellulären Subkern vertreten. Durch die Insets ist zu erkennen, dass hauptsächlich nukleäre (Pfeile) und nur wenige zytoplasmatische STAT5-Moleküle (Pfeilköpfe) detektiert wurden. Wiederum ähnliches gilt für den Pe (Abb. 35e bis -k). Die Verteilung der braungefärbten Zellen in diesem Kerngebiet ist in den beiden Übersichten (Abb. 35e und -h) ersichtlich. Im mittleren und dorsalen Anteil kamen wesentlich mehr Signale vor als im ventralen Teil. Die Detailaufnahmen (Abb. 35f und -g bzw. -i und -k) stammen jeweils aus dem dorsalen, durch die gestrichelte Linie markierten Bereich in Abb. 35e bzw. -h. Auch hier markieren die Pfeile nukleäre und die Pfeilköpfe zytoplasmatische Signale. Die nukleäre STAT5-Translokation im SO wurde allerdings nur durch Leptin (Abb. 35l) induziert (Tab. 18). Die Pfeile im Inset von -l deuten auf eine eindeutig nachweisbare nukleäre Immunreaktivität, neben welcher aber auch zahlreiche zytoplasmatische Signale vorkamen (Pfeilköpfe). Im Kontrolltier (Abb. 35m) hingegen waren ausschließlich zytoplasmatische Signale detektiert (Pfeilköpfe). Am jeweils linken Bildrand von Abb. 35l und -m ist das *Chiasma opticum* (ox) angeschnitten.





**Abb. 35**  
Vergleich der nukleären STAT5-Signale von i.c.v.-Leptin-stimulierten (links) und NaCl-behandelten Ratten (rechts) mit einem Perfusionszeitpunkt von 30min. a und b: Übersicht über

die LH mit nukleären Signalen (braune Punkte) in einer mittleren Dichte. Die Insets heben die markierten Bereiche in einer stärkeren Vergrößerung hervor. Bei beiden Tieren waren viele nukleäre und nur wenige zytoplasmatische Signale vorhanden. c und d: PaV mit starker nukleärer STAT5-Translokation (braune Punkte) nach Leptin- und mittlerer nach NaCl-Behandlung. e-k: Pe mit zahlreichen nukleären STAT5-Signalen (braune Punkte). l: SO mit einigen nukleären und wenigen zytoplasmatischen Signalen. m: SO mit ausschließlich zytoplasmatischen STAT5-Signalen. Die Pfeile deuten auf nukleäre und die Pfeilköpfe auf zytoplasmatische Signale. Eichbalken für a-e und h = 100µm, für f, i, l, m und die Insets in a-d = 50µm, für g, k und die Insets in l und m = 25µm. Für b gilt der Eichbalken in a, für d der in c, für das Inset in b der des Insets von a, für das Inset von d der des Insets in c und für m gilt der Eichbalken in l.

### 3.2.2. *Periphere Stimulation (i.p.)*

#### 3.2.2.1. *Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT5-Translokation*

Um die STAT5-Translokation nach peripherer Leptin-Stimulation (5mg/kg KM, n = 16) mit der nach peripherer Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung (n = 11) vergleichen zu können, wurden die Gehirnschnitte nach unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten mittels der Mehrfachmarkierung (2.8.3.3.) Fluoreszenz-mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde insbesondere auf die Verteilung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation in für die Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts relevanten Kerngebieten des *Hypothalamus* und des Hirnstamms geachtet. Anschließend wurde eine tabellarische Übersicht erstellt, die einen direkten Vergleich zwischen Leptin- und NaCl-induzierter nukleärer STAT5-Expression zuließ (Tab. 19). Hierzu wurden die STAT5-Signale semi-quantitativ mittels eines fünf-Punkte-Bewertungssystems (3.2.1.1.) bewertet. Durch den Vergleich mit den Kontrolltieren ließ sich eine Leptin-induzierte STAT5-Translokation ermitteln.

Bei der neuroanatomischen Auswertung der Gehirnschnitte fiel auf, dass die nukleäre STAT5-Translokation in einem gewissen Zeitraum, abhängig von der Zeit zwischen Stimulation und Perfusion, am intensivsten und häufigsten auftrat (Abb. 36). Die Signaldichte in den einzelnen Hirnstrukturen erreichte, wie hier exemplarisch für den ARC gezeigt, bei denjenigen Ratten ihr Maximum, die zwischen 90 und 150min nach der Stimulation perfundiert wurden, um dann bis 240min *post injectionem* wieder schwächer zu werden. Die meisten Leptin-induzierten nukleären STAT5-Signale traten im ARC, im PMV, im SO und in der RCH auf. In geringer Signaldichte bis vereinzeltem Vorkommen war auch im VMH, im Pe, im *Nucleus praeopticus ventromedialis* (VMPO), im Sch und im TM eine Leptin-



induzierte nukleäre STAT5-Translokation zu verzeichnen. Mit einer mittleren Dichte konnten in Zellen des PC 60 und 240min sowie in Zellen des Ependyms 150min nach der systemischen Stimulation eine Leptin-induzierte STAT5-Expression nachgewiesen werden. In der semi-quantitativen Auswertung wurden, sofern möglich, zur Bestimmung der Signaldichte nukleärer STAT5-Immunreaktivität die Werte aller Leptin- bzw. NaCl-behandelten Tiere mit dem gleichen Perfusionszeitpunkt arithmetisch gemittelt.

### i.p.-Applikation

| <b>Hypothalamische Strukturen</b>           | <b>30'</b>    |             | <b>60'</b>    |             | <b>90'</b>    |             | <b>120'</b>   |             | <b>150'</b>   |             | <b>240'</b>   |             |
|---|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
|   | Leptin<br>n=2 | NaCl<br>n=1 | Leptin<br>n=3 | NaCl<br>n=3 | Leptin<br>n=3 | NaCl<br>n=3 | Leptin<br>n=4 | NaCl<br>n=3 | Leptin<br>n=3 | NaCl<br>n=1 | Leptin<br>n=1 | NaCl<br>n=1 |
| Area periarquata (PAA)                      | +             | ±           | ±             | –           | –             | –           | ±             | +           | ±             | +           | –             | –           |
| Area retrochiasmatica (RCH)                 | ±             | ±           | +             | ±           | ±             | –           | +             | +           | ++            | +           | –             | –           |
| Nucleus arcuatus (ARC)                      | ±             | –           | +             | –           | +             | +           | ++            | +           | ++            | ±           | –             | –           |
| Nucleus hypothalamicus ventromedialis (VMH) | –             | –           | –             | –           | ±             | –           | –             | –           | –             | –           | –             | –           |
| Nucleus paraventricularis (PaV)             | –             | –           | ±             | –           | –             | ±           | –             | –           | ±             | –           | –             | –           |
| Nucleus periventricularis (Pe)              | ±             | –           | ±             | –           | ±             | ±           | ±             | –           | ±             | –           | –             | –           |
| Nucleus praemamillaris ventralis (PMV)      | ±             | –           | +             | –           | ++            | –           | ++            | –           | ++            | –           | –             | –           |
| Nucleus praeopticus ventromedialis (VMPO)   | –             | –           | +             | –           | –             | –           | –             | –           | –             | –           | –             | –           |
| Nucleus suprachiasmaticus (SCh)             | ±             | –           | +             | –           | –             | –           | –             | –           | –             | –           | –             | –           |
| Nucleus supraopticus (SO)                   | ±             | –           | +             | ±           | –             | –           | ++            | –           | +             | +           | –             | –           |
| Nucleus tuberomamillaris (TM)               | –             | –           | –             | +           | ±             | ±           | +             | –           | ±             | –           | –             | –           |
| <b>Medulla oblongata</b>                    |               |             |               |             |               |             |               |             |               |             |               |             |
| Nucleus raphe obscurus (ROb)                | +             | +           | +             | +           | +             | +           | +             | +           | +             | +           | +             | +           |
| Nucleus raphe pallidus (RPa)                | +             | +           | +             | +           | +             | +           | +             | +           | +             | +           | +             | +           |
| Nucleus tractus solitarius (Sol)            | +             | –           | –             | +           | –             | –           | +             | +           | +             | –           | +             | +           |
| Nucleus dorsomotorius nervi vagus (MNV)     | +             | –           | +             | –           | –             | –           | +             | +           | +             | ++          | –             | –           |
| <b>Andere Zelltypen</b>                     |               |             |               |             |               |             |               |             |               |             |               |             |
| Cellulae ependymales                        | +             | –           | +             | –           | +             | –           | –             | +           | ++            | +           | +             | –           |
| Plexus choroideus (PC)                      | +             | +           | ++            | +           | +             | –           | +             | +           | +             | ++          | ++            | –           |

**Tab. 19**

**Semi-quantitative Auswertung der Signaldichte nukleärer STAT5-Immunreaktivität nach systemischer Leptingabe im Vergleich zu den Kontrolltieren zu verschiedenen Perfusionszeitpunkten (30, 60, 90, 120, 150 und 240min). Die Signalhäufigkeit wurde mittels eines fünf-Punkte-Bewertungssystems ermittelt: +++ = hohe Signaldichte, ++ = mittlere Signaldichte, + = niedrige Signaldichte, ± = nur vereinzelte und – = keine nukleären Signale. Die Grundlage für die Nomenklatur der Kerngebiete und Strukturen bildete der Rattengehirnatlas (Paxinos and Watson 1998).**

In Abb. 36 wurde die Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation (rote Punkte) in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Am Beispiel des ARC, der sehr gut auf systemisch appliziertes Leptin reagierte, wurden die Gehirne unterschiedlicher Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten der Perfusion *post injectionem* (30, 60, 90, 120, 150, und 240min) zwischen –2,56mm bis –3,14mm von Bregma ausgewertet. Zum Zeitpunkt von 30 (Abb. 36a) und 60min (-b) waren nur vereinzelte bis wenige Signale detektiert worden. Trotz individueller Unterschiede in der Dichte und Intensität der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Immunreaktivität fand zwischen 90 und 150min nach der Stimulation die stärkste STAT5-Translokation nach systemischer Leptingabe statt. Wenngleich die Signale zu den Zeitpunkten 90min (Abb. 36c) und 150min (-e) intensiver und in einer höheren Dichte vertreten waren, kamen sie bei dem hier verwendeten Tier 120min *post injectionem* (Abb. 36d) in gleicher Dichte, aber in einer etwas schwächeren Intensität vor. Schließlich war zum Zeitpunkt 240min nach der Stimulation (Abb. 36f) keine nukleäre STAT5-Translokation mehr nachzuweisen.

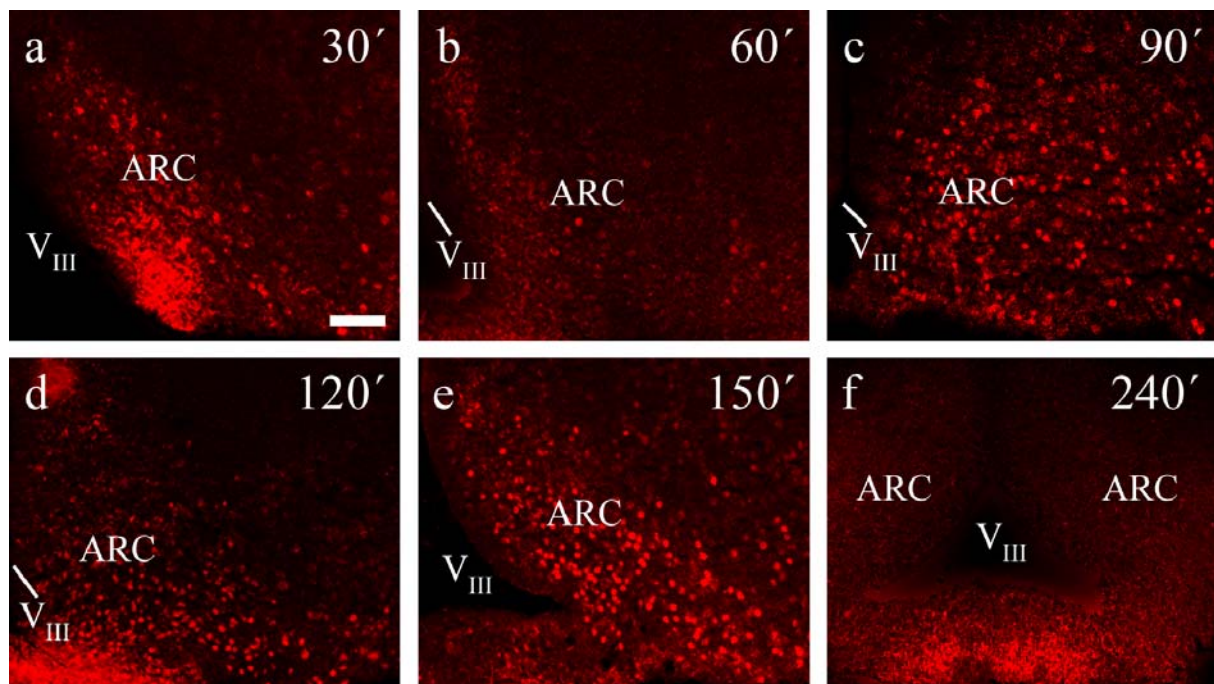


Abb. 36

**Zeitabhängigkeit der i.p.-Leptin-induzierten nukleären STAT5-Immunreaktivität (rote Signale) am Beispiel des ARC in etwa auf Höhe zwischen –2,56mm und –3,14mm von Bregma. a:** Zum Perfusionszeitpunkt von 30min war die Signaldichte gering. **b:** Bei einer Ratte, die 60min *post injectionem* perfundiert wurde, wurden nur vereinzelte nukleäre STAT5-Signale gefunden. **c:** Intensive Signale in einer hohen Dichte zum Zeitpunkt 90min. **d:** Starke Signale in mittlerer Dichte zum Zeitpunkt 120min. **e:** Die selbe Intensität und Häufigkeit der nukleären STAT5-Signale wie in c zum Zeitpunkt 150min. **f:** Zum Zeitpunkt 240min waren keine Signale mehr zu vermerken. Eichbalken für a-f = 100µm.

Im nächsten Schritt wurden hypothalamische Kerngebiete nach Leptin-Behandlung mit denen von Kontrolltieren anhand mikroskopischer Bildtafeln verglichen. Der ARC (Abb. 37a und -b), der PMV (Abb. 37c und -d), die RCH (Abb. 37e und -f), der Pe (Abb. 38a und -b) der SO (Abb. 38c und -d) sowie der TM (Abb. 38e und -f) repräsentierten gut auf Leptin reagierende Strukturen (Tab. 19). Zur Verdeutlichung der nukleären Translokation wurden die Schnitte für STAT5 (rot) und DAPI (blau) doppelmarkiert. Durch die Übereinanderlagerung beider Markierungen entstanden pinkfarbene Signale im Falle der Kolo-kalisation. Es wurden Tiere mit unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten ausgewählt, da, wie bereits gezeigt, die stärkste nukleäre STAT5-Translokation zum Zeitpunkt 90 bis 150min festgestellt wurde (Abb. 36). Die Pfeile markieren jeweils nukleäre, die Pfeilköpfe zytoplasmatische STAT5-Immunreaktivität. Abb. 37a zeigt den ARC auf Höhe -2,56mm von Bregma eines 120min nach systemischer Leptin-Applikation perfundierten Tieres, bei welchem die nukleären STAT5-Signale (pink) in einer hohen Dichte und Intensität vorkamen. Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 37b den ARC auf gleicher Höhe wie -a von einem NaCl-behandelten Tier mit einem Perfusionszeitpunkt von 120min. Die Ausprägung der nukleären Signale (Pfeile) war deutlich schwächer, sie waren vor allem im medialen und lateralen ARC in mittlerer Dichte bei guter Intensität vertreten. Im dorsalen Anteil herrschten hauptsächlich zytoplasmatische Signale vor (Pfeilköpfe im Inset), wohingegen im Leptin-behandelten Tier nukleäre Signale detektiert wurden (Abb. 37a). Abb. 37c und -d veranschaulichen den Unterschied der nukleären STAT5-Translokation nach Leptin- und NaCl-Behandlung am Beispiel des PMV auf Höhe -3,8mm von Bregma. Die Perfusion fand bei beiden Tieren 90min nach der Stimulation statt. In Abb. 37c sind deutliche nukleäre Signale (pink) zu erkennen, dies ist durch die Detailaufnahme in der oberen linken Ecke nochmals hervorgehoben (Pfeile). Im PMV des Kontrolltieres (Abb. 37d) wurden ebenfalls nukleäre Signale detektiert, die aber in ihrer Intensität nur sehr gering ausgeprägt waren. Die Immunreaktivität war vor allem im Zentrum des Zellkerns vertreten. Dies ist bei höherer Auflösung der Insets besser zu erkennen. Ausschließlich in der unteren rechten Ecke von Abb. 37d sind einige intensivere nukleäre STAT5-Signale vertreten. Abb. 37e und -f demonstrieren die Verhältnisse für die RCH mit einem Perfusionszeitpunkt von 120min. In Abb. 37e kommen nukleäre STAT5-Signale in einer hohen Dichte mit guter Intensität vor. Im Kontrolltier (Abb. 37f) hingegen waren diese nukleären Signale nur im ventralen Bereich der RCH unterhalb des V<sub>III</sub> zu erkennen. Direkt oberhalb dieser nukleären Signale befinden sich zahlreiche zytoplasmatische, im Inset mit Pfeilköpfen markierte, Signale.

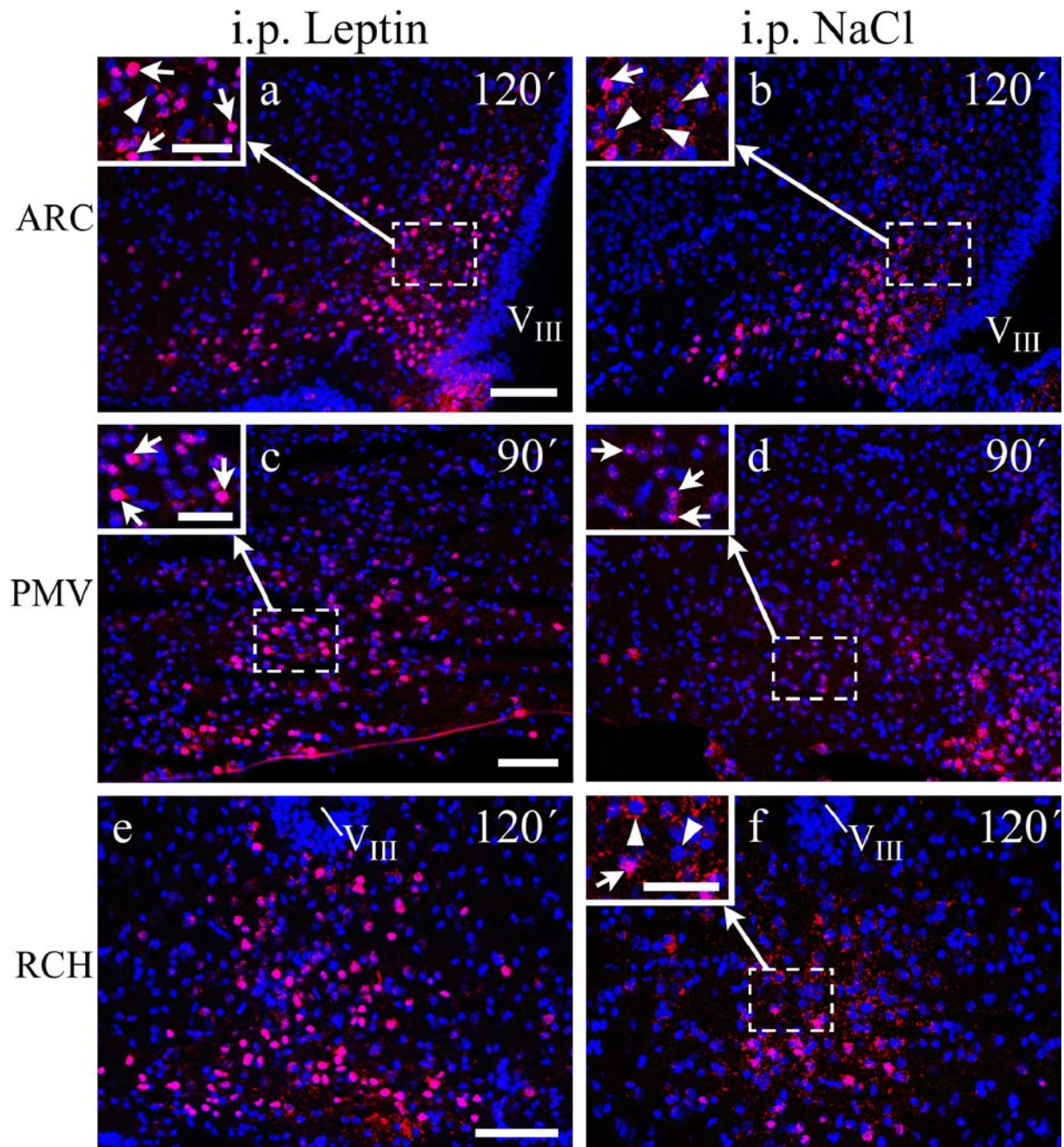


Abb. 37

Gegenüberstellung der STAT5-Immunreaktivität 90min (PMV) bzw. 120min (ARC und RCH) nach i.p.-Applikation von Leptin (links) und NaCl (rechts). Zum Nachweis des nukleären Ursprungs der STAT5-Signale wurde die STAT5- und DAPI-Markierung übereinandergelagert. Die Pfeile markieren jeweils nukleäre und die Pfeilköpfe zytoplasmatische Signale a: Ausschnitt des ARC mit zahlreichen STAT5-positiven Kernen (Pfeile) sowie vereinzelt zytoplasmatischen Signalen (Pfeilkopf). b: Ausschnitt des ARC mit einigen nukleären (Pfeil im Inset) und zahlreichen zytoplasmatischen Signalen (Pfeilköpfe). c: Ausschnitt des PMV mit deutlichen nukleären Signalen (pink), detailliert im Inset dargestellt (Pfeile). d: PMV-Ausschnitt mit zytoplasmatischen und vereinzelt nukleären Signalen in der unteren rechten Ecke (pink). e: RCH-Ausschnitt mit prominenten nukleären Signalen (pink). f: RCH-Ausschnitt mit wenigen nukleären aber vielen zytoplasmatischen STAT5-Signalen (Pfeilköpfe im Inset). Eichbalken für a-f = 100µm und für alle Insets = 50µm. Für b gilt der Eichbalken in a, für d der in c, für f der in e, für das Inset in b der des Insets in a und für das Inset in d gilt der Eichbalken im Inset von c.



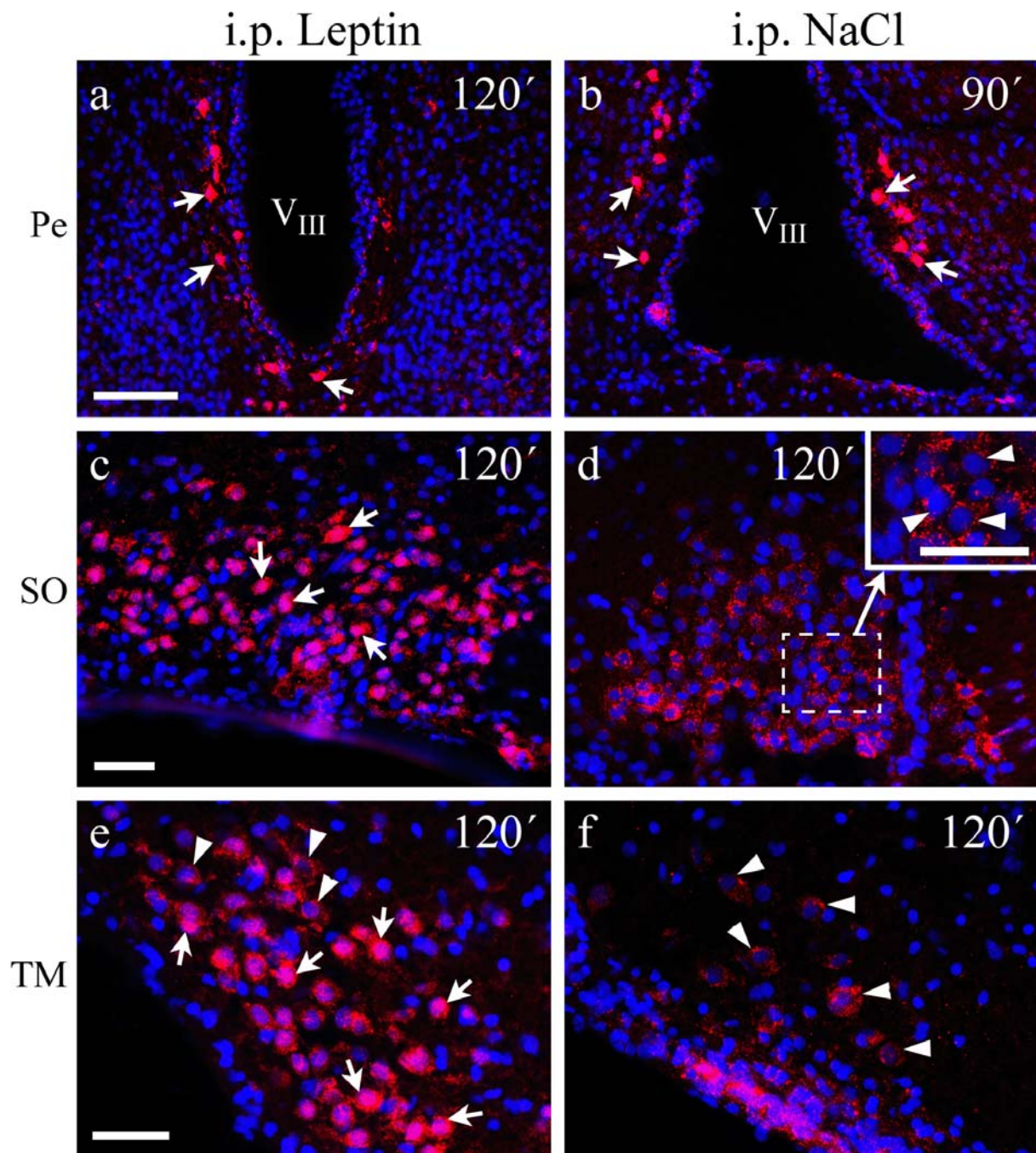


Abb. 38

Gegenüberstellung der STAT5-Immunreaktivität in verschiedenen Kerngebieten des *Hypothalamus* 90min (b) bzw. 120min (a und c-f) nach i.p.-Applikation von Leptin (links) und NaCl (rechts). Zum Nachweis des nukleären Ursprungs der STAT5-Signale wurde die STAT5- und DAPI-Markierung übereinandergelagert. a: Ausschnitt des Pe mit vereinzelten prominenten pinken, STAT5-positiven Kernen (Pfeile). b: Ausschnitt des Pe mit ebenfalls vereinzelten nukleären Signalen (Pfeile). c: Ausschnitt des SO mit deutlichen STAT5-positiven Zellkernen (Pfeile). d: SO-Ausschnitt mit ausschließlich zytoplasmatischer Immunreaktivität (Pfeilköpfe). e: TM-Ausschnitt mit vielen nukleären (Pfeile), aber auch einigen zytoplasmatischen Signalen (Pfeilköpfe). f: TM-Ausschnitt mit zytoplasmatischer STAT5-Immunreaktivität (Pfeilköpfe). Eichbalken für a und b = 100µm und c-f sowie das Inset in d = 50µm. Für b gilt der Eichbalken in a, für d der in c und für f gilt der Eichbalken in e.

Drei weitere Kerngebiete zeigten nach systemischer Leptin-Behandlung eine nukleäre STAT5-Translokation (Abb. 38). In Abb. 38a und -b ist der Pe eines Leptin-behandelten

Tieres 120min (-a) und einer NaCl-behandelten Ratte 90min (-b) nach der Stimulation dargestellt. In beiden Fällen ließen sich vereinzelt nukleäre STAT5-positive Zellkerne (Pfeile) nachweisen. Dass die Unterschiede im Pe gering sind, spiegelt sich auch in Tab. 19 wieder. Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Signale kamen nur vereinzelt vor. Im SO hingegen bestanden große Unterschiede zwischen Leptin- und NaCl-Behandlung. Der in Abb. 38c dargestellte SO zeigt 120min *post injectionem* nukleäre STAT5-Signale (Pfeile) in einer mittleren Dichte und starker Immunreaktivität. Das Kontrolltier (Abb. 38d) hingegen wies in diesem Kerngebiet nur eine zytoplasmatische STAT5-Expression (Pfeilköpfe) auf. Das Gleiche ließ sich im TM wiederfinden (Abb. 38e und -f). 120min nach Leptin-Stimulation war die nukleäre STAT5-Translokation (Pfeile) deutlich zu erkennen, wobei aber auch einige zytoplasmatische Signale detektiert wurden (Pfeilköpfe). In Abb. 38f hingegen sieht man sehr gut die großen Zellen mit ausschließlich zytoplasmatisch markiertem STAT5 (Pfeilköpfe).

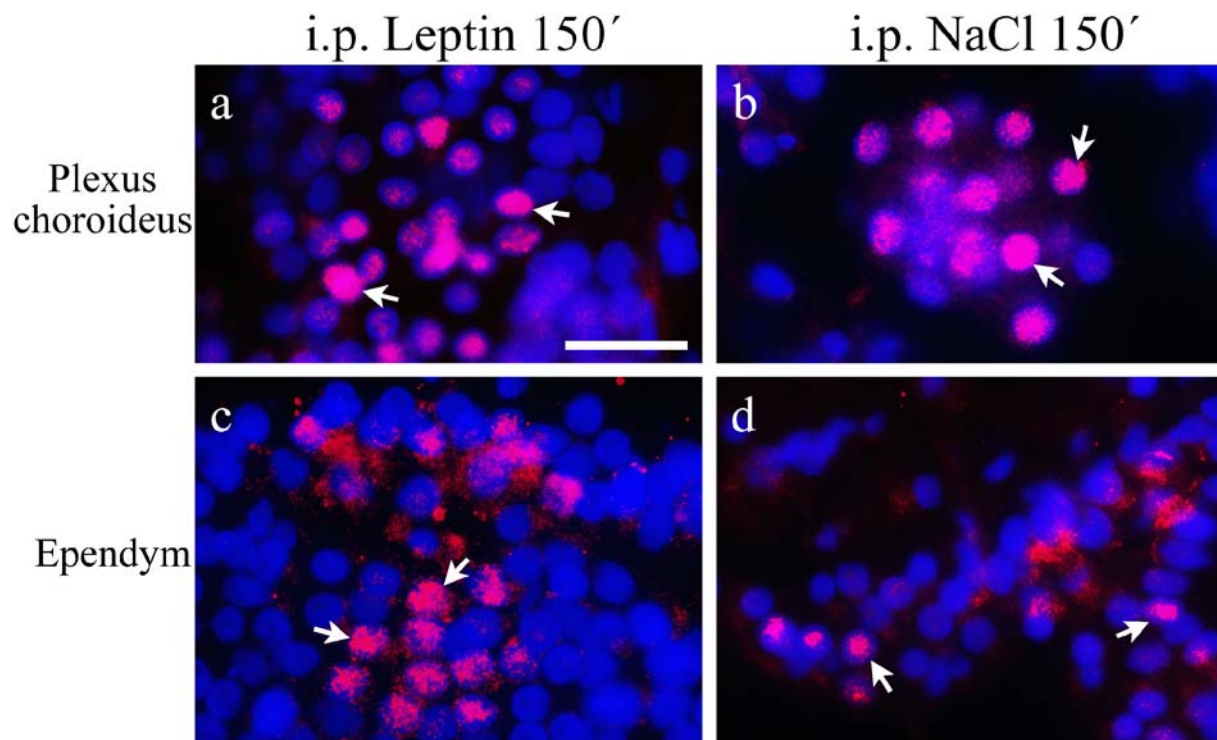


Abb. 39

Vergleich der STAT5-Immunreaktivität in Zellen des *Plexus choroideus* (PC, a und b) der  $V_I$  und des Ependyms des  $V_{III}$  (c und d) nach systemischer Leptin- (links) und NaCl-Applikation (rechts). Die Ratten wurden 150min nach der Stimulation perfundiert. Der Nachweis der STAT5-Translokation wurde mit der Doppelmarkierung von STAT5 (rot) und DAPI (blau) durchgeführt. a und b: Deutliche nukleäre Signale (Pfeile) in einigen Zellkernen. c und d: Nukleäre STAT5-Translokation mit geringerer Intensität (Pfeile), wobei nach Leptin-Applikation mehr STAT5-Signale zu erkennen sind als im Kontrolltier. Eichbalken für a-d = 25µm.

Neben den in Abb. 37 und Abb. 38 gezeigten Kerngebieten kamen innerhalb des *Hypothalamus* auch im Ependym des  $V_{III}$  und außerhalb des *Hypothalamus* in Zellen des PC

der  $V_1$  (Abb. 39) nukleäre STAT5-Signale vor. Durch die Doppelmarkierung von STAT5 (rot) und DAPI (blau) ließen sich in diesen Zellen nukleäre Signale (pink) nachweisen. In Abb. 39a und -b sind jeweils Ausschnitte des PC abgebildet. Die Tiere wurden 150min nach der Stimulation perfundiert. Bei dem Leptin-behandelten Tier (links) konnten ebenso viele und intensive nukleäre Signale (Pfeile) detektiert werden wie im Kontrolltier (rechts). Abb. 39c und -d zeigen einen Ausschnitt aus dem Ependym des  $V_{III}$  150min nach systemischer Leptin- bzw. NaCl-Gabe. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich in einigen ependymalen Zellen wenig intensive nukleäre STAT5-Signale (Pfeile) finden. Im Gegensatz dazu kamen im zugehörigen Kontrolltier STAT5-positive Zellen (Pfeile) nur vereinzelt vor.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 90 bis 150min nach systemischer Applikation eine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation in den hypothalamischen Kerngebieten ARC (besonders im medialen und lateralen, aber im Gegensatz zu STAT3 auch im dorsalen Anteil), PMV, RCH, SO und TM sowie in Zellen des Ependyms des  $V_{III}$  vorkam. Die STAT5-Translokation in Zellen des PC schien unspezifisch zu sein.

### 3.2.2.2. Quantitative Auswertung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation

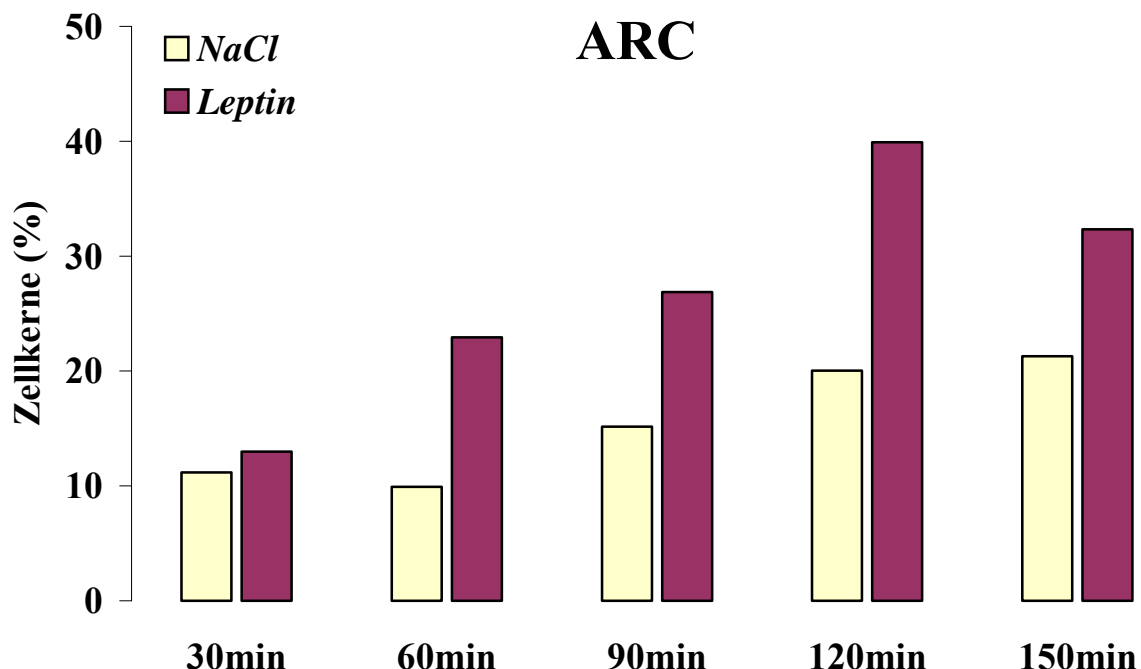


Abb. 40

Zeitliche Gegenüberstellung der nukleären STAT5-Translokation im ARC zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Leptin-Stimulation (rote Balken) im Vergleich zu den Kontrolltieren (gelbe Balken). Die Balken spiegeln den prozentualen Anteil der STAT5-positiven Kerne an allen DAPI-markierten Kernen wieder.

Im Folgenden wurden die nukleären STAT5-Signale durch Zellzählungen quantifiziert und die Ergebnisse graphisch dargestellt (2.10.1.2.). Für die hypothalamischen Kerngebiete ARC, RCH und PMV, in welchen schon bei der semi-quantitativen Beurteilung deutliche Unterschiede der STAT5-Expression (Tab. 19) aufgefallen waren, wurde die zeitabhängige Darstellung im Vergleich zu den Kontrolltieren in Abb. 40, 41 und 43 dargestellt. Der prozentuale Anteil der STAT5-positiven an allen DAPI markierten Zellen erreichte 120min *post injectionem* im ARC (Abb. 40) mit ca. 40% nach Leptingabe (rote Balken) und ca. 23% nach NaCl-Applikation (gelbe Balken) sein Maximum. Die Anzahl der Leptin-induzierten STAT5-positiven Zellen war 60min nach der Stimulation 2,3fach höher als bei den Kontrolltieren. 120min *post injectionem* betrug der Faktor das Zweifache.

In der RCH (Abb. 41) lagen bis 90min nach der Stimulation relativ konstante Werte (um ca. 16%) der STAT5-Translokation nach Leptingabe vor, bis es zum Zeitpunkt 150min zu einem Maximum von ca. 33% STAT5-markierten Zellen kam. Der Anteil der STAT5-positiven Zellen bei den Kontrolltieren blieb überwiegend auf einem konstanten Niveau um 10%. 150min nach Leptingabe war die Anzahl der STAT5-positiven Zellen 2,6mal höher als nach NaCl-Applikation. Dieser Wert wurde zu keinem anderen Zeitpunkt übertroffen.

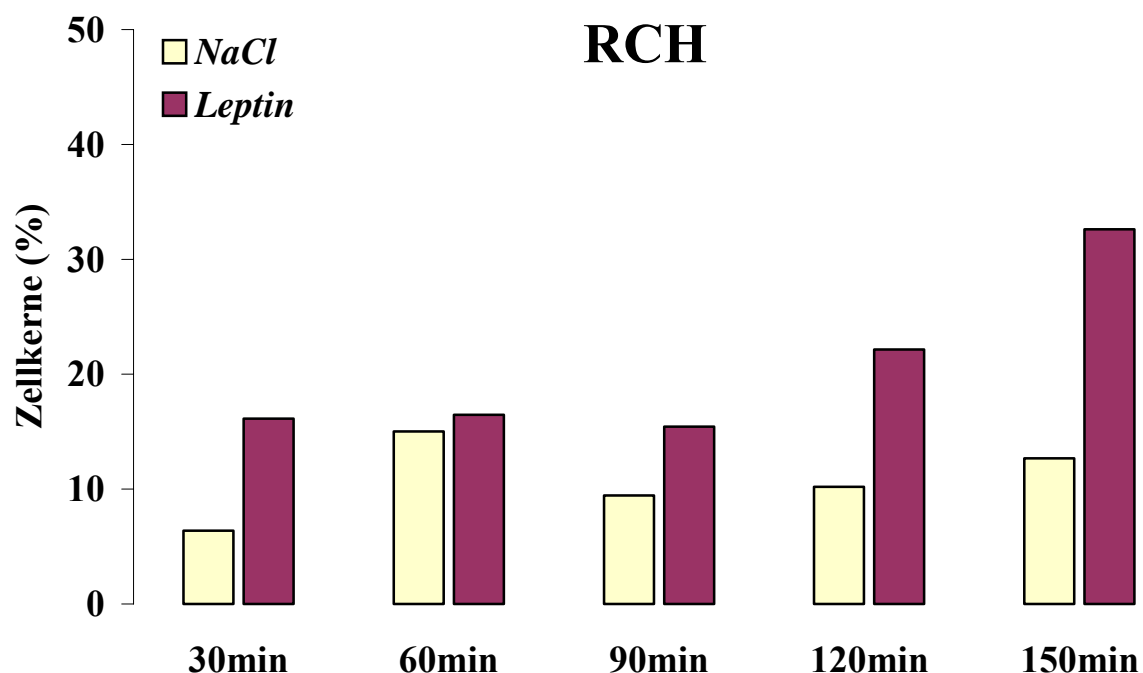


Abb. 41

Zeitliche Gegenüberstellung der nukleären STAT5-Translokation in der RCH zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Leptin-Stimulation (rote Balken) im Vergleich zu den Kontrolltieren (gelbe Balken). Die Balken spiegeln den prozentualen Anteil der STAT5-positiven Kerne an allen DAPI-markierten Kernen wieder.



Der PMV war die Struktur, die von diesen drei Kerngebieten am besten auf systemisch appliziertes Leptin reagierte (Tab. 19 und Abb. 42). Ab 60min nach der Stimulation erreichte der Anteil der STAT5-positiven Zellkerne Werte von 24% (60min) bis 29% (120min) aller DAPI-markierten Zellkerne, wobei die STAT5-positiven Zellen bei den Kontrolltieren bis zu einem Anteil von höchstens 12% (150min) vorkamen. Zu dem optimalen Zeitpunkt von 120min stieg der Anteil der positiven Zellen um das ca. Vierfache über den der Kontrolltiere an.

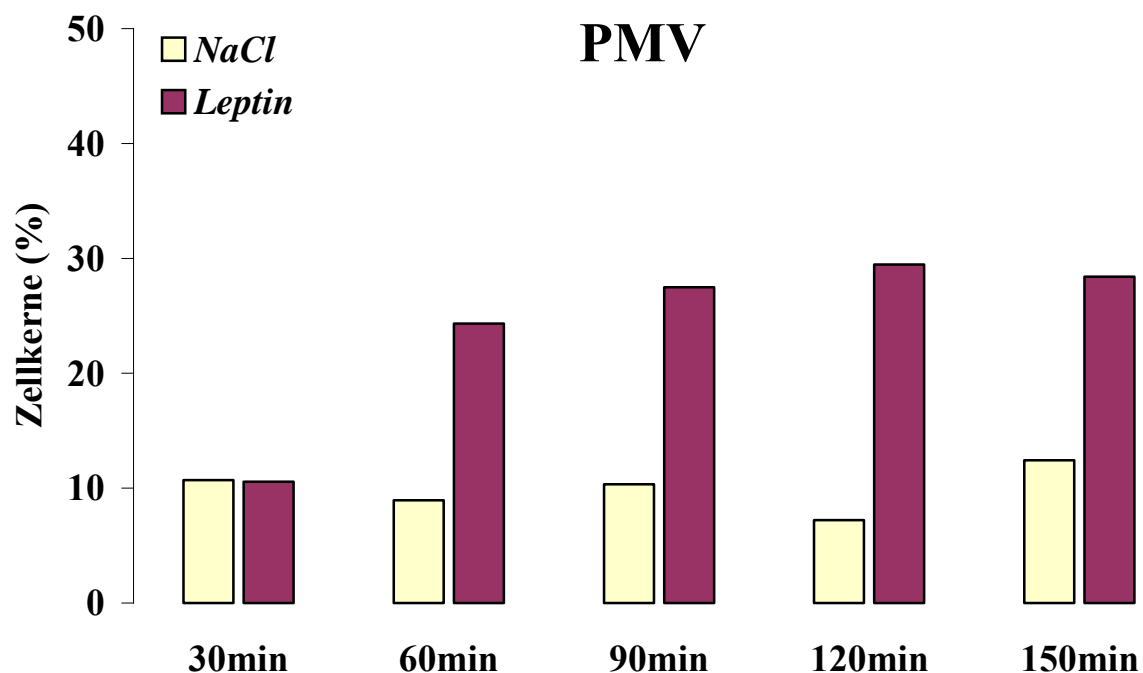


Abb. 42

Zeitliche Gegenüberstellung der nukleären STAT5-Translokation im PMV zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Leptin-Stimulation (rote Balken) im Vergleich zu den Kontrolltieren (gelbe Balken). Die Balken spiegeln den prozentualen Anteil der STAT5-positiven Kerne an allen DAPI-markierten Kernen wieder.

### 3.2.2.3. Neuroanatomischer Nachweis der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation in unterschiedlichen Zelltypen des zentralen Nervensystems

#### 3.2.2.3.1. STAT5-Translokation in Neuronen

Für die hypothalamischen Kerngebiete ARC, PMV, RCH, PE, SO und TM, die mit nukleärer STAT5-Expression 90 bis 150min nach systemischer Leptingabe antworteten, sollte der zelluläre Ursprung nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde mit immunhistochemischer Dreifachmarkierung von STAT5 (rot), DAPI (blau) und einem zellspezifischen Marker für

NeuN, vW-Faktor oder GFAP (jeweils grün) geführt. Lagert man die einzelnen Farbkkanäle übereinander, entstehen durch die Kolo-kalisationen von STAT5 und DAPI pinke (nukleäre Signale), durch die Kolo-kalisation von STAT5 und NeuN gelbe (neuronale Signale) und durch die Kolo-kalisation von DAPI und NeuN (Kerne von Neuronen) türkisfarbene Signale. Abb. 44 zeigt am Beispiel des ARC auf Höhe  $-2,56\text{mm}$  von Bregma eine solche Dreifachmarkierungsstudie bei einem 150min nach der Leptin-Stimulation perfundierten Tier. Abb. 44a, -c, -e und -g bzw. -b, -d, -f und -h, welche Detailaufnahmen der gestrichelt-markierten Bereiche in Abb. 44a, -c, -e und -g sind, zeigen dieselben Ausschnitte. In der oberen Reihe (Abb. 44a und -b) ist die Einfachmarkierung von STAT5 zu sehen. Deutlich ist die Verteilung der STAT5-positiven Zellen in der Übersichtsaufnahme (Abb. 44a) durch die rote Immunreaktivität in einer hohen Signaldichte zu erkennen. Die zweite Reihe (Abb. 44c und -d) zeigt die NeuN-Markierung desselben ARC-Ausschnitts. Auffällig war, dass die Immunreaktivität für NeuN im ARC gegenüber dem VMH deutlich vermindert war (Abb. 44c). Dieses Phänomen traf auch auf andere hypothalamische Kerngebiete wie zum Beispiel den Pe und den SO (Abb. 43) zu. Außerdem reagierten Zellen, in denen STAT5 relativ stark markiert war, zumeist schwächer auf die Neuronen-spezifische Detektion mit NeuN (Pfeilköpfe in Abb. 44d). Dies traf auch für die RCH (Abb. 45c bis -e) zu.

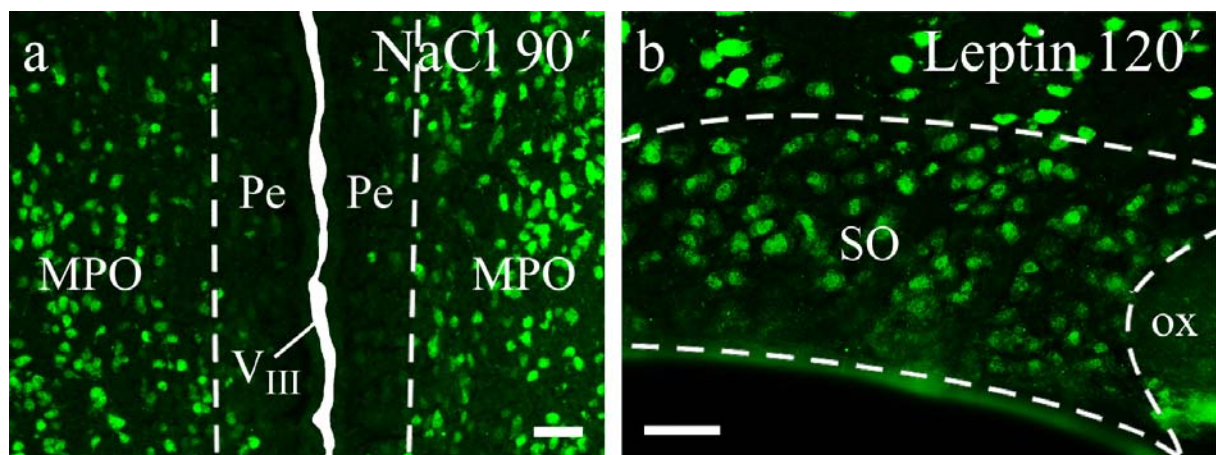


Abb. 43

**Intensität der NeuN-Immunreaktivität in den hypothalamischen Kerngebieten Pe (a) und SO (b).** a: Vergleichsweise geringe Intensität der NeuN-Immunreaktivität im Pe eines Kontrolltieres mit einem Perfusionszeitpunkt von 90min. Im angrenzenden *Nucleus praeopticus medialis* (MPO) war NeuN in den Neuronen viel stärker markiert. b: Im SO einer Ratte 120min nach Leptingabe war die NeuN-Reaktivität in den Neuronen viel geringer als in der angrenzenden Region. Dieses Phänomen ist unabhängig von der Behandlung (NaCl oder Leptin) und der Zeit (30 bis 150min). Eichbalken für a und b =  $50\mu\text{m}$ .

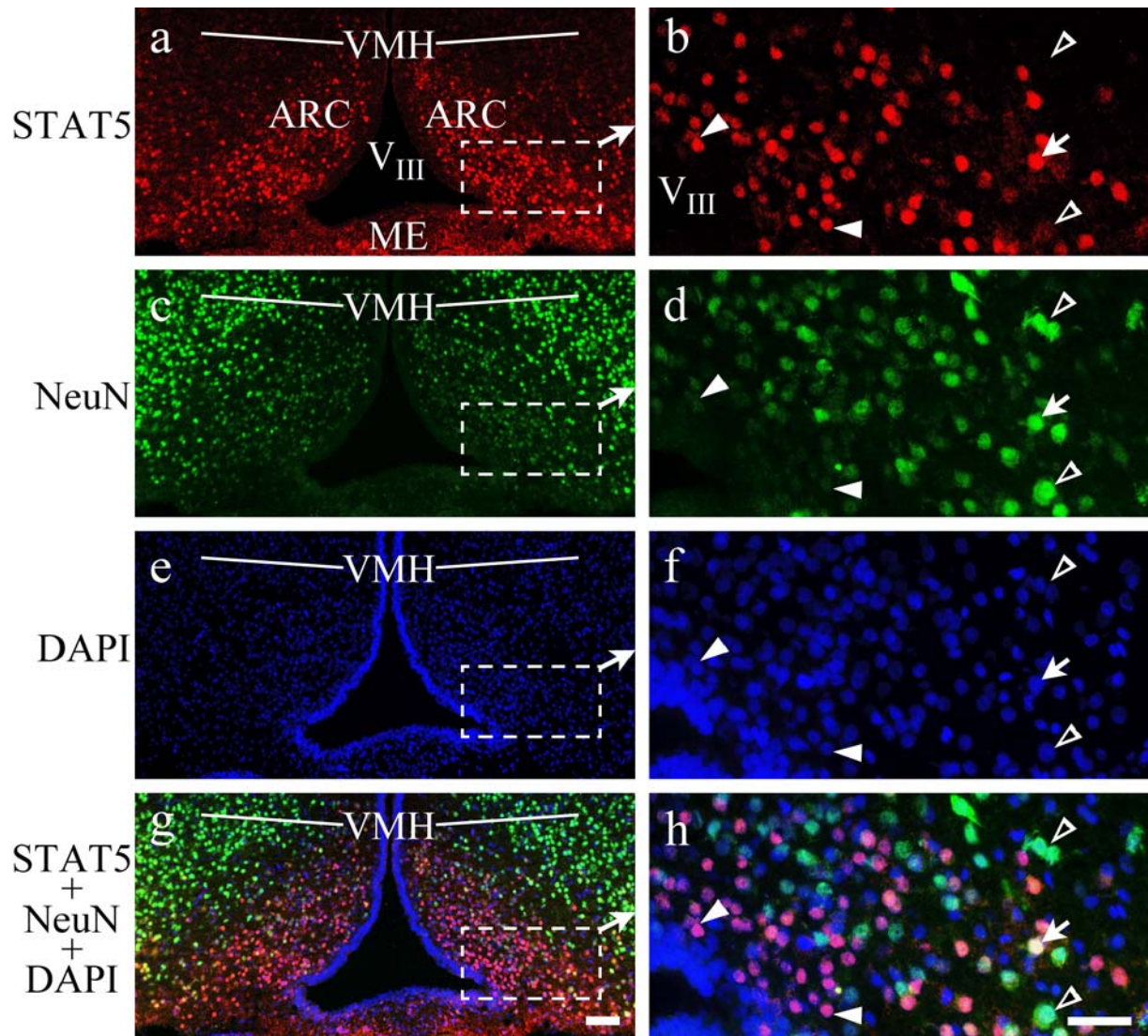


Abb. 44

Darstellung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation zum Nachweis des neuronalen Ursprungs im ARC eines 150min nach der Stimulation perfundierten Tieres. Der Nachweis wurde mittels der Dreifachmarkierung von STAT5, DAPI und NeuN geführt. Die linke Reihe (a, c, e und g) zeigt eine Übersicht des ARC in etwa auf Höhe  $-2,56\text{mm}$  von Bregma, die rechte Reihe (b, d, f und h) zeigt die in a, c, e und g gezeigten Ausschnitte im Detail. a und b: Markierung von STAT5. Die roten Signale sind im gesamten ARC, aber vor allem im ARC-M und ARC-L, links und rechts des  $V_{III}$  angeordnet. c und d: Derselbe Ausschnitt des ARC wie a bzw. b, aber mit der NeuN-Markierung (grün-markierte Neurone). e und f: DAPI-markierte Zellkerne (blau) desselben ARC-Ausschnitts. g und h: Übereinanderlagerung aller Farbkanäle (rot: a, b; grün: c, d; blau: e, f) zum Nachweis der Kolokalisation von STAT5 mit Zellkernen und/oder Neuronen. Die Pfeile in b, d und h zeigen auf einen STAT5-positiven Zellkern eines Neurons (gelb). Die geschlossenen Pfeilköpfe markieren STAT5-positive Zellkerne, die nicht eindeutig neuronalen Ursprungs sind. Die offenen Pfeilköpfe weisen auf den Kern von Neuronen, die kein STAT5 exprimieren. Eichbalken für a, c, e und g =  $100\mu\text{m}$  sowie für b, d, f und h =  $50\mu\text{m}$ .

Die dritte Reihe (Abb. 44e und -f) zeigt die blaue DAPI-Markierung sämtlicher Zellkerne. Durch die Übereinanderlagerung der STAT5-, NeuN- und DAPI-Markierung kamen die beiden Bilder in der unteren Reihe (Abb. 44g und -h) zustande. Alle pinkfarbenen Signale (Pfeilköpfe in Abb. 44h) waren jeweils übereinandergelagerte rote und blaue Signale, diese

STAT5-Translokation war nukleären Ursprungs. Alle gelb erscheinenden Immunreaktivitäten (Pfeil in Abb. 44h) zeigen eine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation in Neuronen des ARC an. Die Pfeile, Pfeilköpfe und offenen Pfeilköpfe in den Detailaufnahmen (rechts) zeigen in allen Bildern auf die jeweils selben Zellkerne. Neurone mit nukleären STAT5-Signalen sind durch Pfeile, STAT5-negative Neurone sind durch offene Pfeilköpfe markiert. Die geschlossenen Pfeilköpfe deuten auf STAT5-positive Zellkerne, bei denen es sich nicht um Neurone bzw. um Neurone mit nur sehr schwacher NeuN-Immunreaktivität handelt.

Der Nachweis für den neuronalen Ursprung von Leptin-induzierten nukleären STAT5-Signalen wurde in Abb. 45 für die Kerngebiete PMV (-a und -b), RCH (-c, -d und -e) und Pe (-f, -g und -h) geführt. Abb. 45a zeigt eine Übersicht über den PMV und einen Teil des ARC in etwa auf Höhe -4,16mm von Bregma eines 90min *post injectionem* perfundierten Tieres. Deutlich sind einige nukleäre Signale (pink) in der Doppelmarkierung von STAT5 (rot) und DAPI (blau) in beiden hypothalamischen Kerngebieten zu erkennen. Ein anderer PMV-Ausschnitt ist in einer höheren Auflösung in Abb. 45b gezeigt. Die Pfeile deuten auf dreifachmarkierte STAT5-positive Zellkerne von Neuronen, wohingegen der Pfeilkopf auf ein STAT5-negatives Neuron zeigt. In Abb. 45c, -d und -e sind Anschnitte der RCH eines 120min *post injectionem* perfundierten Tieres abgebildet. In der Übersichtsaufnahme (Abb. 45c) lässt sich sehr gut die nukleäre STAT5-Translokation (pink) erkennen. Durch die Detailaufnahmen (Abb. 45d und -e) wird verdeutlicht, dass einige nukleäre Signale eindeutig neuronalen Ursprungs waren (Pfeile), wobei viele andere STAT5-positive Zellen kaum NeuN-markiert (Pfeilköpfe) waren. Dies sind vor allem solche Zellen, die am stärksten STAT5-exprimieren (vergleiche Abb. 44b und -d). Abb. 45d verdeutlicht dies durch das Hervorheben der NeuN-Immunreaktivität für diesen Ausschnitt. In der unteren Reihe (Abb. 45f bis -h) ist der Pe von einem 150min nach der Stimulation perfundierten Tier gezeigt. Die Übersicht (Abb. 45f) zeigt den V<sub>III</sub> mit dem ihn umgebenden Kerngebiet Pe, in welchem einige nukleäre STAT5-Signale (pink) detektiert wurden. In diesem Kerngebiet war die oben beschriebene Problematik, dass die Detektion von NeuN hier nur von geringer Intensität war, wieder zu erkennen (siehe auch Abb. 43). Dem gegenüber war die NeuN-Immunreaktivität in den angrenzenden Strukturen wieder deutlich ausgeprägt. Abb. 45g und -h sind hochauflösende Abbildungen von dem Ausschnitt in Abb. 45f. Abb. 45g zeigt eine Doppelmarkierung von STAT5 (rot) und NeuN (grün) mit gelb erscheinender neuronaler STAT5-Translokation (Pfeile). In Abb. 45h wurden dieselben Signale mit der Dreifachmarkierung von STAT5, NeuN und DAPI als neuronale, nukleäre Translokation nachgewiesen (Pfeile). Der Pfeilkopf markiert ein STAT5-negatives Neuron.



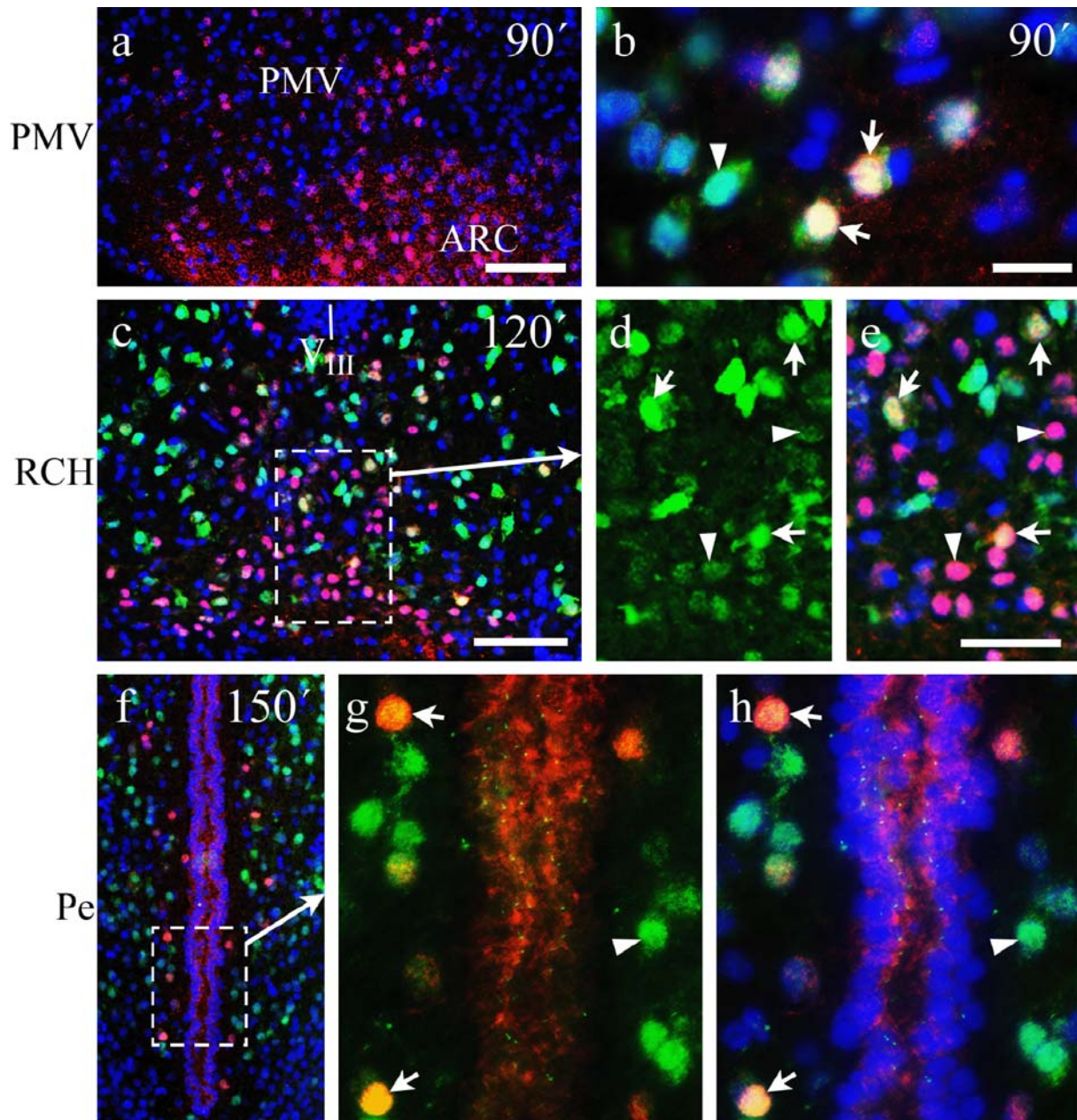
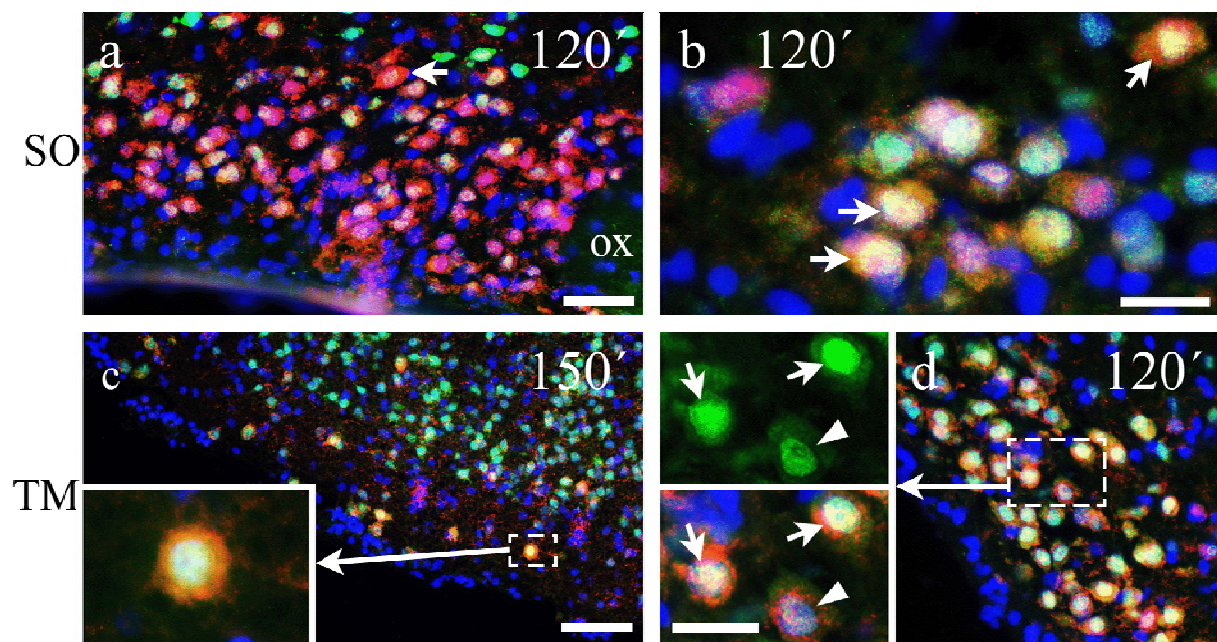


Abb. 45

Darstellung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation im PMV (a und b), der RCH (c, d und e) und des Pe (f-h) nach unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten (PMV 90min, RCH 120min und Pe 150min). Die Dreifachmarkierung (STAT5, DAPI, NeuN) diente dem Nachweis des zellulären und nukleären Ursprungs STAT5-positiver Zellen. a: Übersicht über den PMV in etwa auf Höhe  $-4,16\text{mm}$  von Bregma mit zahlreichen nukleären STAT5-Signalen (pink). b: Höhere Auflösung eines PMV-Ausschnitts mit der Dreifachmarkierung. Die Pfeile deuten auf STAT5-positive Neuronenkerne. Der Pfeilkopf markiert ein STAT5-negatives Neuron. c: RCH mit zahlreichen nukleären Signalen (pink). d: Höhere Auflösung des gestrichelt-markierten Bereiches in c mit der Einfachmarkierung von NeuN. e: Derselbe Ausschnitt wie d mit der Dreifachmarkierung. Die Pfeile markieren dieselben STAT5-positiven Neurone wie die Pfeile in d, wohingegen die Pfeilköpfe auf dieselben schwach NeuN-positiven, aber stark STAT5-reaktiven Zellen wie die Pfeilköpfe in d weisen. f: Pe mit einigen nukleären STAT5-Signalen um den  $V_{III}$  (pink). g und h: Detailaufnahmen des gestrichelt-markierten Ausschnitts aus f. g: Doppelmarkierung von STAT5 und NeuN zum Nachweis des neuronalen Ursprungs der STAT5-positiven Zellen. h: Dreifachmarkierung zum Nachweis des nukleären Ursprungs der neuronalen STAT5-Translokation. Die Pfeile weisen auf dieselben STAT5-positiven Neuronenkerne wie die Pfeile in g, der Pfeilkopf markiert dasselbe STAT5-negative

**Neuron wie der Pfeilkopf in g. Eichbalken für a, c und f = 100µm, für d und e = 50µm und für b, g sowie h = 25µm. Für f gilt der Eichbalken aus a.**

Abb. 46 zeigt den Nachweis der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation nach systemischer Leptingabe in magnozellulären Neuronen des SO (Abb. 46a und -b) und TM (-c und -d) in einer Dreifachmarkierungsstudie (STAT5, DAPI und NeuN). In Abb. 46a ist der SO eines 120min *post injectionem* perfundierten Tieres abgebildet. Nahezu alle nukleären STAT5-Signale waren neuronalen Ursprungs (gelb). Die STAT5-Immunreaktivität ist auch im Zytoplasma der Neurone durch eine rote „Corona“ um den Zellkern herum zu erkennen (Pfeil). Dies ist in höherer Auflösung in Abb. 46b noch einmal für den SO verdeutlicht. Die Pfeile deuten auf eindeutige STAT5-positive Neurone. Das Neuron oben rechts zeigt sehr deutlich die zytoplasmatisch und nukleär lokalisierte STAT5-Immunreaktivität. In Abb. 46c und -d ist der TM eines 150min (-c) und eines 120min (-d) nach systemischer Leptin-Applikation perfundierten Tieres dargestellt.



**Abb. 46**

Darstellung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Immunreaktivität im SO (a und b) und TM (c und d) mit der Dreifachmarkierung von STAT5 (rot), DAPI (blau) und NeuN (grün). Der Perfusionszeitpunkt für den SO betrug 120min *post injectionem* und für den TM 150min (c) bzw. 120min (d). a: SO mit zahlreichen nukleären STAT5-Signalen (pink), die fast ausschließlich neuronalen Ursprungs sind (gelb). b: Detailaufnahme eines anderen SO mit nukleären, neuronalen STAT5-Signalen (Pfeile). Die STAT5-Immunreaktivität existiert auch im Zytoplasma der Neurone (deutlich an der Zelle rechts oben zu erkennen). c: Übersicht über den TM mit gelb markierten nukleären neuronalen Signalen. Das Inset zeigt ein STAT5-positives Neuron. Die STAT5-spezifische Immunreaktivität war sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vorhanden. d: TM mit zahlreichen nukleären STAT5-Signalen in Neuronen (Pfeile in den Insets). Der Pfeilkopf weist auf ein STAT5-positives Neuron, das nur schwach NeuN-markiert ist. Eichbalken für c = 100µm, für a und d = 50µm und für b, die Insets in c sowie d = 25µm. Für das Inset in c gilt der Eichbalken von b.

Im Inset von Abb. 46c ist die gestrichelt-hervorgehobene Zelle aus -c in einer hohen Auflösung gezeigt. Durch die Dreifachmarkierung von STAT5, NeuN und DAPI ließ sich das Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Signal eindeutig im Neuron nachweisen. Die Immunreaktivität von STAT5 ist jedoch ebenso im Zytoplasma dieses Neurons zu erkennen. Neben dieser Zelle sind noch einige andere STAT5-positive Neurone gelb detektiert (Übersicht). In Abb. 46d ist ein anderer TM-Ausschnitt mit zahlreichen neuronalen STAT5-Signalen zum Zeitpunkt 120min nach Leptingabe abgebildet. Die Insets zeigen denselben markierten Bereich aus Abb. 46d in einer höheren Auflösung und zeigen deutlich die STAT5-positiven Neurone (Pfeile und Pfeilkopf im unteren Inset) in diesem Kerngebiet. Der Pfeilkopf markiert ein nur schwach NeuN- aber stark STAT5-reaktives Neuron.

Nachfolgend sollte gezeigt werden, dass fast alle STAT5-positiven Zellen in den hypothalamischen Kerngebieten ARC, PMV, RCH, SO und TM zum optimalen Zeitpunkt von 120min *post injectionem* Neurone waren (Abb. 47). Durch die Auszählung von Zellen (2.10.1.2.), die einerseits STAT5- und andererseits NeuN-markiert waren, konnten diese Daten graphisch dargestellt werden. Nur ca. 20% aller DAPI-markierten Zellen im ARC zeigten im Kontrolltier nukleäre STAT5-Signale, dagegen waren 120min nach Leptingabe ca. 40% STAT5-positiv (gelbe Balken). Diese Verdopplung der Signale schien spezifisch (Leptin-induziert) zu sein und unterschied sich signifikant von der Kontrollsituation ( $p = 0,011$ ). Betrachtet man nun den Anteil der Neurone (rote Balken) an allen STAT5-positiven Zellen im ARC, so stellt man fest, dass der überwiegende Anteil der STAT5-positiven Zellen neuronaler Natur war. Nach NaCl-Applikation machte dies einen Anteil von ca. 86% und nach Leptingabe von ca. 79% aus. Jedoch schien die Leptin-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der STAT5-positiven Neurone in diesem Kerngebiet zu haben. Im PMV induzierte eine 120min dauernde periphere Leptin-Stimulation in ca. 30% aller DAPI-markierten Zellen eine STAT5-Translokation, wohingegen unter Kontrollsituation signifikant ( $p = 0,028$ ) weniger Zellen STAT5-positiv waren (ca. 7%). Der Anteil der STAT5-positiven Neurone entsprach nach Leptingabe ca. 19%, was etwa 94% aller STAT5-positiven Zellen waren. Dieser Anteil war signifikant unterschiedlich ( $p = 0,037$ ) zu dem Anteil, der durch NaCl-Applikation induziert wurde. Gemessen an allen STAT5-positiven Zellen waren dies hier ca. 92%. Somit hatte Leptin einen signifikant positiven Einfluss auf die Aktivierung der STAT5-Moleküle in Neuronen des PMV. Im Gegensatz dazu stand der Einfluss von Leptin auf die RCH. Hier war 120min *post injectionem* der Anteil der STAT5-positiven Zellen an allen DAPI-markierten Zellen bei den Kontrolltieren (ca. 10%) nicht signifikant unterschiedlich zu dem nach Leptingabe (ca. 22%).



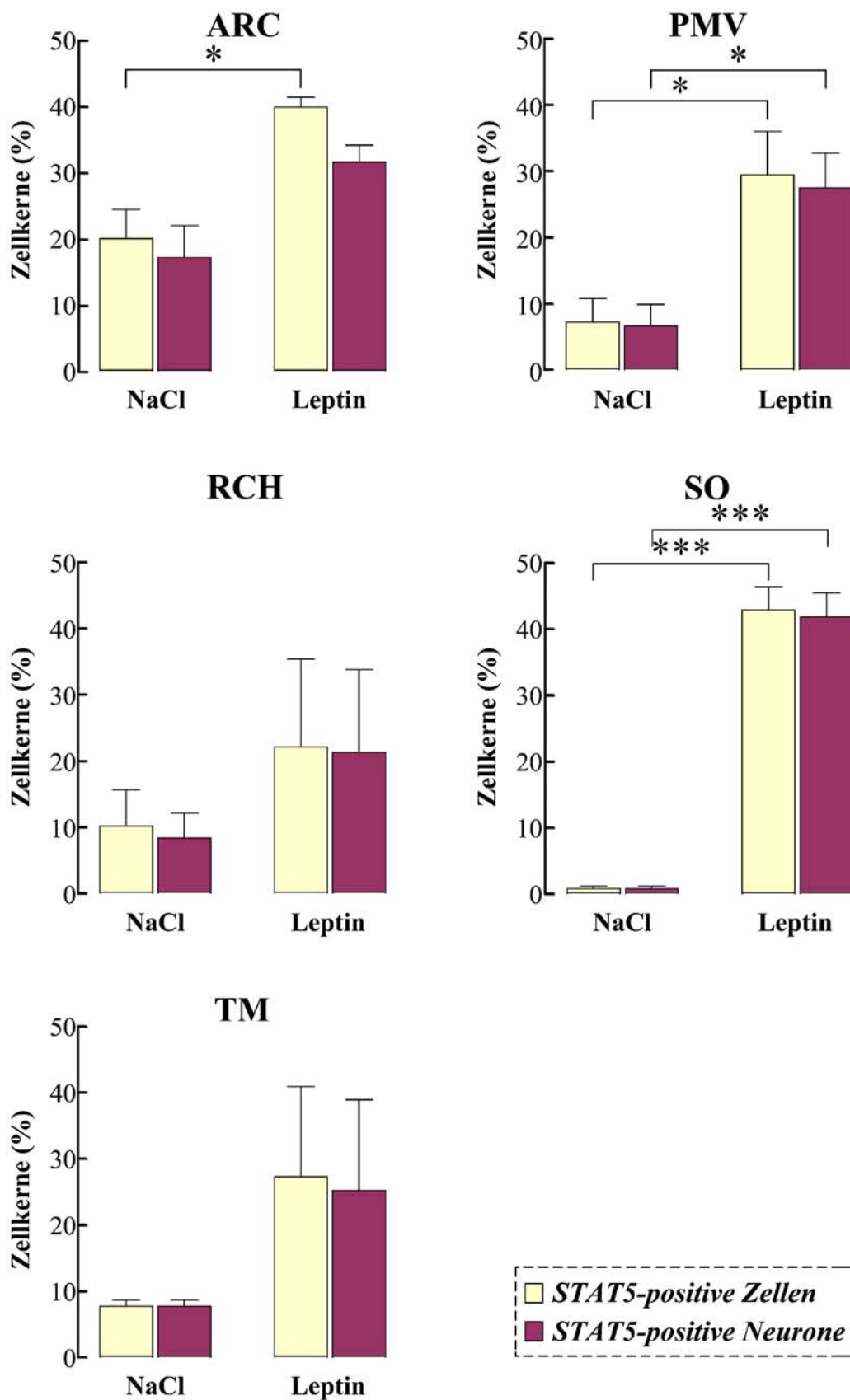


Abb. 47

Quantitative Auswertung der nukleären neuronalen STAT5-Translokation im ARC, PMV, RCH, SO und TM 120min nach Leptin- (jeweils rechts) und NaCl-Applikation (jeweils links). Die gelben Balken verdeutlichen die prozentualen Anteile der STAT5-positiven an allen DAPI-markierten Zellen. Die roten Balken zeigen die prozentualen Anteile der STAT5-positiven Neurone an allen DAPI-markierten Zellen an. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .



Das Gleiche galt für den Anteil der STAT5-markierten Neurone. Bei den Kontrolltieren waren im Mittel etwa 8% aller DAPI-markierten Zellen STAT5-positive Neurone, was ein Anteil von etwa 82% aller STAT5-detektierten Zellen ausmachte. Nach Leptingabe erhöhte sich der neuronale Anteil im Mittel auf ca. 21% (das waren etwa 96% aller STAT5-positiven Zellen). Der deutlichste Effekt der Leptin-Stimulation zeigte sich im SO. So waren 120min nach Leptin-Applikation ca. 43% der DAPI-positiven Zellen auch STAT5-positiv, wobei im Gegensatz dazu bei den Kontrolltieren nur unter 1% STAT5-aktiviert waren. Dieser Anstieg (ca. 52fach) unterschied sich somit hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) zwischen der Leptin- und NaCl-Applikation. Genauso groß war der signifikante Unterschied zwischen der Leptin- und NaCl-Behandlung in Bezug auf den neuronalen Anteil der STAT5-positiven Zellen (98% nach Leptin- und 100% nach NaCl-Gabe). Nur ca. 8% aller DAPI-markierten Zellen im TM reagierten bei den Kontrolltieren mit einer STAT5-Translokation, dagegen waren in den Leptin-stimulierten Tieren etwa 27% STAT5-positiv. Der neuronale Anteil der STAT5-positiven Zellen lag unter Kontrollsituation im Mittel bei 100% und nach Leptin-Applikation bei etwa 92%. Sowohl der Unterschied der STAT5-positiven Zellen (gelbe Balken) als auch des neuronalen Anteils (rote Balken) war im TM zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant.

#### **3.2.2.3.2. STAT5-Translokation in Astrozyten**

Da, wie im vorherigen Kapitel gezeigt, für einige STAT5-positive Zellen im ARC (Abb. 44), im PMV und in der RCH (Abb. 45) ein nicht neuronaler Ursprung zu vermuten war, wurden im nächsten Schritt Kolokalisationsstudien mit einem Zellmarker für Astrozyten durchgeführt (Abb. 48 und Abb. 49). Durch die immunhistochemische Dreifachmarkierung von STAT5 (rot), DAPI (blau) und dem astrozytenspezifischen Marker GFAP (grün) sollte eine mögliche astrozytäre Beteiligung nach systemischer Leptin-Stimulation nachgewiesen werden. Der Nachweis für STAT5-positive Zellen im ARC ist in Abb. 48 bildlich dargestellt. Abb. 48a zeigt eine Übersicht über den ARC-L und ARC-M mit deutlichen STAT5-Signalen in einer hohen Dichte. In den Detailaufnahmen (Abb. 48b und -c), die von den beiden gestrichelt-markierten Bereichen in Abb. 48a stammen, sind wenige STAT5-positive Astrozyten detektiert (Pfeile). Die Kerne dieser Zellen sind von der grünen GFAP-Immunreaktivität umgeben. Von ihnen gehen strahlenförmig auslaufende Zellfortsätze ab. Zusätzlich waren auch einige STAT5-negative Astrozyten (Pfeilköpfe) zu finden.

Das heißt, dass im ARC nicht nur Neurone, sondern auch vereinzelte Astrozyten mit einer STAT5-Aktivierung nach systemischer Leptingabe reagierten.

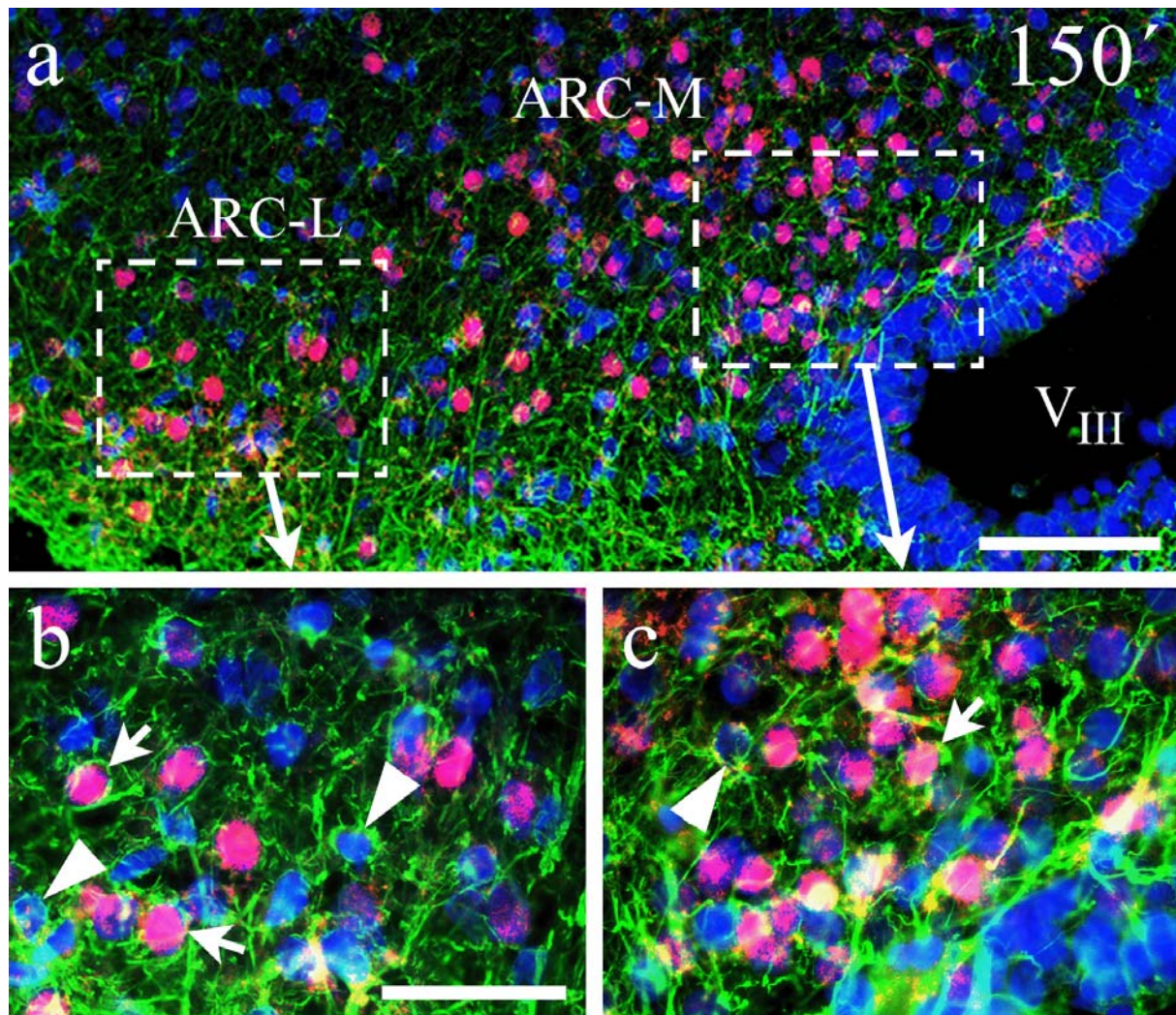


Abb. 48

Darstellung eines ARC-Ausschnitts (ca. Bregma -2,56mm) mit Dreifachmarkierung von STAT5 (rot), DAPI (blau) und GFAP (grün) 150min nach der systemischen Leptin-Behandlung. a: Übersicht über den ARC-M und den ARC-L mit zahlreichen nukleären STAT5-Signalen (pink). b: Detailaufnahme des linken gestrichelt-markierten Bereichs aus a in einer höheren Auflösung. Unter den nukleären Signalen sind einige astrozytäre STAT5-Signale (Pfeile) zu finden. Die Pfeilköpfe weisen auf STAT5-negative Astrozyten. c: Die Vergrößerung des rechten gestrichelt-markierten Bereichs aus a zeigt vereinzelte nukleäre STAT5-Signale mit astrozytärem Ursprung (Pfeil). Der Pfeilkopf weist auf einen STAT5-negativen Astrozyten. Eichbalken für a = 100µm und für b sowie c = 50µm.

Für die hypothalamischen Kerngebiete RCH und PMV wurde ebenfalls eine Kolokalisationsstudie mit STAT5, DAPI und GFAP in Abb. 49 durchgeführt. In Abb. 49a, -b und -c ist die Dreifachmarkierung für eine RCH 30min nach systemischer Leptin-Stimulation gezeigt. Abb. 49a ist eine Übersichtsaufnahme der RCH in etwa auf Höhe -1,88mm von Bregma mit nukleärer STAT5-Translokation (pink) in den relativ großen Zellen der RCH. Zur besseren Demonstration wurden zwei Aufnahmen aus diesem Bereich in einer höheren Auflösung dargestellt. Abb. 49b stammt aus dem oberen gestrichelt-markierten Bereich in -a und Abb. 49c hebt den unteren durch gestrichelte Linien markierten Bereich in -a hervor.



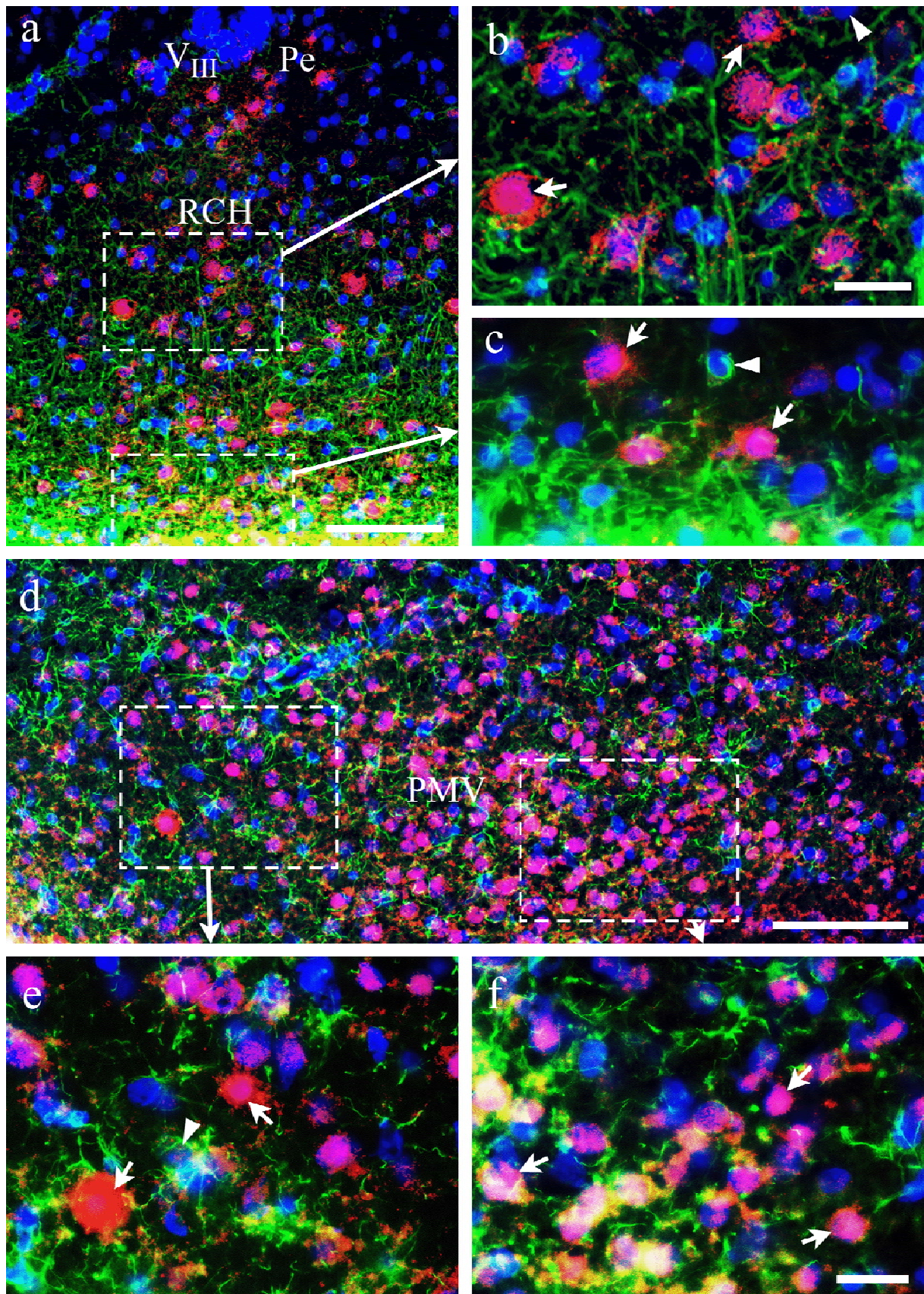


Abb. 49

Durch die Dreifachmarkierung (STAT5, DAPI, GFAP) dargestellte Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation in der RCH (a, b und c) und dem PMV (d, e und f). Die Pfeile markieren jeweils STAT5-positive nicht astrozytäre Zellen. Die Pfeilköpfe weisen auf STAT5-negative Astrozyten. a: Übersicht über die RCH eines 30min *post injectionem* perfundierten Tieres mit nukleären STAT5-Signalen (pink). b: Höhere Auflösung des in a gestrichelt-markierten oberen

**Bereichs. Es ist keine astrozytäre nukleäre STAT5-Translokation in diesem Ausschnitt detektiert. c: Detailaufnahme des in a gestrichelt-markierten unteren Bereiches ohne STAT5-positive Astrozyten. d: Übersichtsaufnahme des PMV eines 60min nach systemischer Leptingabe perfundierten Tieres. Es sind zahlreiche nukleäre STAT5-Signale (pink) zu erkennen. e: Detailaufnahme des linken gestrichelt-umrandeten Bereichs aus d. In diesem Ausschnitt ist keine astrozytäre nukleäre STAT5-Translokation vorhanden. f: Der in d markierte rechte Bereich in einer höheren Auflösung ebenfalls ohne STAT5-positive Astrozyten. Zellen mit Leptin-induzierter nukleärer STAT5-Translokation zeigen keine Kolo-kalisation mit dem astrozytären Zellmarker GFAP in der RCH und dem PMV. Eichbalken für a und d = 100µm und für b, c, e sowie f = 25µm. Für c gilt der Eichbalken in b und für f gilt der in e.**

In beiden Ausschnitten lassen sich keine STAT5-positiven Astrozyten eindeutig nachweisen. Die Pfeile markieren Zellen mit nukleärer STAT5-Translokation, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit neuronalen Ursprungs waren (Abb. 45c bis -e). Im Gegensatz dazu sind einige, eindeutig als Astrozyten ansprechbare, Zellen durch Pfeilköpfe markiert. Abb. 49d zeigt die Übersicht des PMV eines 60min nach der Stimulation perfundierten Tieres. Deutlich sind die zahlreich vorkommenden Leptin-induzierten nukleären STAT5-Signale (pink) zu erkennen. Um eine bessere Aussage über den astrozytären Ursprung dieser STAT5-Translokation machen zu können, wurden die beiden mit der gestrichelten Linie hervorgehobenen Bereiche in einer höheren Auflösung gezeigt (Abb. 49e und -f). Auch im PMV war keine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation in Astrozyten eindeutig nachweisbar. Die durch die Pfeile markierten Zellkerne sind STAT5-positiv und mit großer Wahrscheinlichkeit in Neuronen lokalisiert (Abb. 45a und -b). Der Pfeilkopf in Abb. 49e zeigt auf den Kern eines eindeutig identifizierbaren STAT5-negativen Astrozyten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellen in hypothalamischen Strukturen, die nach systemischer Leptin-Applikation mit einer nukleären STAT5-Translokation antworteten, zum größten Teil neuronalen Ursprungs und nur eine kleine Subpopulation aller STAT5-positiven ARC-Zellen astrozytären Ursprungs waren.

#### ***3.2.2.3.3. STAT5-Translokation in Ependymzellen***

Für die Zellen des Ependyms des V<sub>III</sub>, die nach systemischer Leptingabe mit einer nukleären STAT5-Translokation reagierten und für Zellen des PC der V<sub>I</sub> (Abb. 39), konnte ein neuronaler und astrozytärer Ursprung ausgeschlossen werden. In Abb. 50 wurde dies auf der linken Hälfte für den PC und auf der rechten für die Ependymzellen dargestellt. Das obere Drittel der Abbildung (-a bis -c) ist eine Kolo-kalisationsstudie mit NeuN zum Ausschluss des neuronalen Ursprungs und die beiden unteren Drittel (-d bis -h) mit GFAP zum Ausschluss des astrozytären Ursprungs der nukleären STAT5-Translokation.



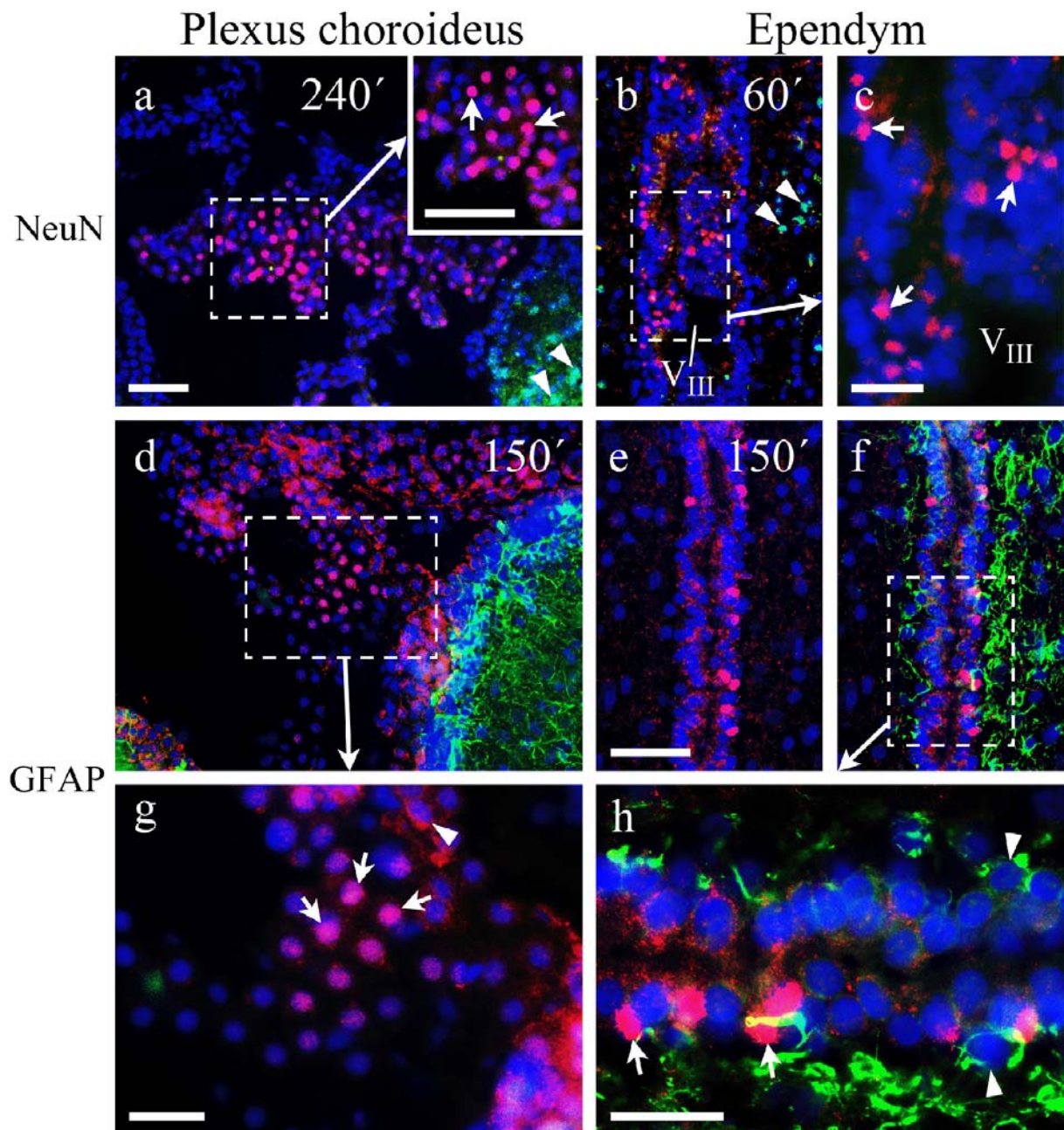


Abb. 50

Darstellung der nukleären STAT5-Translokation im *Plexus choroideus* (PC) der  $V_1$  (links) und in Ependymzellen des  $V_{III}$  mittels der immunhistochemischen Dreifachmarkierung (STAT5, DAPI, NeuN (a-c) bzw. GFAP (d-h)) von i.p.-Leptin-stimulierten Ratten (rechts). a: Übersicht eines PC-Ausschnittes 240min *post stimulationem* mit deutlichen nukleären STAT5-Signalen. Die Pfeilköpfe deuten auf Neurone im angrenzenden Hirngewebe. Das Inset verdeutlicht nukleäre Signale, die nicht mit der NeuN-Immunreaktivität kolokalisiert sind (Pfeile). b: Ependym des  $V_{III}$  mit nukleärer STAT5-Translokation (pink) 60min nach der Stimulation. Am rechten Bildrand sind im angrenzenden Gewebe NeuN-markierte Neurone (Pfeilköpfe) zu erkennen. c: Detailaufnahme des gestrichelt-hervorgehobenen Bereichs in b. Die STAT5-Signale (Pfeile) sind eindeutig nicht mit NeuN kolokalisiert. d: PC 150min *post injectionem*, mit zahlreichen nukleären und zytoplasmatischen Signalen (pink). In den beiden unteren Ecken sind GFAP-markierte Astrozyten (grün umrandet) detektiert. g: Der in d gestrichelt-markierte Bereich in einer höheren Auflösung. Die Pfeile deuten auf nicht astrozytäre nukleäre STAT5-Signale. Der Pfeilkopf markiert eine STAT5-negative Zelle. e: Ausschnitt des Ependyms 150min nach Leptingabe mit einigen nukleären Signalen (pink). f: Derselbe Ausschnitt wie e, aber in der Dreifachmarkierung mit GFAP. h: Detailaufnahme von dem um 90° gedrehten Ausschnitt aus f. Die nukleären Signale (Pfeile) sind nicht von der GFAP-Immunreaktivität (grün) umgeben und

**damit nicht astrozytären Ursprungs. Die Pfeilköpfe markieren STAT5-negative Astrozyten. Eichbalken für a, Inset in a, b, d, e und f = 50µm und für c, g sowie h = 25µm. Für b und d gilt der Eichbalken in a und für f gilt der Eichbalken in e.**

Abb. 50a zeigt einen Ausschnitt des PC einer Ratte, die 240min nach systemischer Leptin-Applikation perfundiert wurde, mit der Dreifachmarkierung von STAT5, DAPI und NeuN. In vielen Zellen wurden nukleäre STAT5-Signale (pink) gefunden. In der unteren rechten Ecke ist Hirngewebe angeschnitten, in welchem Neurone (Pfeilköpfe) durch die NeuN-Markierung grün gefärbt wurden. Der markierte Bereich ist durch das Inset mit einer höheren Auflösung hervorgehoben. Die STAT5-positiven PC-Zellen sind nicht mit der NeuN-Immunreaktivität kolokalisiert. Abb. 50d und -g zeigen die Kolokalisationsstudie mit GFAP 150min nach der Leptin-Stimulation. In der Übersicht (Abb. 50d) sieht man im PC sowohl STAT5-positive Zellkerne als auch ausgeprägte zytoplasmatische STAT5-Signale am oberen Bildrand. Die GFAP-Markierung hingegen ist ausschließlich in den beiden unteren Ecken zu sehen, wo Ventrikel-umgebendes Hirngewebe angeschnitten ist. Der markierte Bereich ist in Abb. 50g detailliert dargestellt. Auch in der höheren Auflösung ist keine Kolokalisation der nukleären STAT5-Signale mit Astrozyten nachweisbar. Diese Kolokalisationsstudie am PC zeigte, dass diese Zellen höchstwahrscheinlich PC-Zellen (spezialisierte Ependymzellen) waren, obgleich es sich hier scheinbar nicht um Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Signale handelte (3.2.2.1.). Hingegen waren die Signale im Ependym des V<sub>III</sub> Leptin-induziert. Abb. 50b und -c zeigen die STAT5-, DAPI- und NeuN-Markierung des Ependyms eines 60min *post injectionem* perfundierten Tieres. Die in Abb. 50c in hoher Auflösung hervorgehobenen STAT5-Signale sind nicht mit der grünen Immunreaktivität von NeuN (Pfeilköpfe in Abb. 50b) kolokalisiert und somit nicht neuronalen Ursprungs. Abb. 50e, -f und -h zeigen das Ependym eines 150min nach der Leptin-Stimulation perfundierten Tieres mit einigen nukleären STAT5-Signalen. Bei Abb. 50e handelt es sich um eine Doppelmarkierung von STAT5 und DAPI und dient dem Beweis der nukleären Lokalisation der STAT5-Translokation. Derselbe Ausschnitt wie Abb. 50e, aber mit zusätzlicher GFAP-Markierung, ist in Abb. 50f dargestellt. Hier wird deutlich, dass die grün markierten Astrozyten ausschließlich außerhalb des Ependyms des V<sub>III</sub> vorkamen. Die Detailaufnahme (Abb. 50h) beweist, dass die Zellkerne, die STAT5-positiv sind, nicht von Astrozyten stammen, da sie nicht mit GFAP kolokalisiert sind (Pfeile). Der Pfeilkopf weist auf einen STAT5-negativen Zellkern eines Astrozyten.

Somit konnten auch andere Zelltypen außer Neurone und Astrozyten, wie zum Beispiel Ependymzellen, nach systemischer Leptingabe mit einer nukleären STAT5-Translokation antworten.

### 3.2.3. Neuroanatomischer Vergleich der nukleären STAT5-Translokation nach zentraler und peripherer Leptin-Applikation

#### i.c.v.- gegen i.p.-Applikation

|  | 30'           |             | 60'           |             | 90'         | 120'          |             | 150'        | 240'        |
|--|---------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
|  | i.c.v.<br>n=2 | i.p.<br>n=3 | i.c.v.<br>n=2 | i.p.<br>n=4 | i.p.<br>n=3 | i.c.v.<br>n=2 | i.p.<br>n=4 | i.p.<br>n=3 | i.p.<br>n=1 |
| <b>Hypothalamische Strukturen</b>          |               |             |               |             |             |               |             |             |             |
| Area retrochiasmatica (RCH)                | –             | ±           | –             | +           | ±           | –             | +           | ++          | –           |
| Nucleus arcuatus (ARC)                     | ++            | ±           | +             | +           | +           | +             | ++          | ++          | –           |
| Nucleus paraventricularis (PaV)            | +++           | –           | –             | ±           | –           | –             | –           | ±           | –           |
| Nucleus periventricularis (Pe)             | +++           | ±           | –             | ±           | ±           | –             | ±           | ±           | –           |
| Nucleus praemamillaris ventralis (PMV)     | +             | ±           | –             | +           | ++          | –             | ++          | ++          | –           |
| Nucleus praeopticus magnocellularis (MCPO) | +             | –           | –             | –           | –           | –             | –           | –           | –           |
| Nucleus praeopticus ventromedialis (VMPO)  | –             | –           | –             | +           | –           | –             | –           | –           | –           |
| Nucleus suprachiasmaticus (SCh)            | –             | ±           | –             | +           | –           | –             | –           | –           | –           |
| Nucleus supraopticus (SO)                  | ++            | ±           | –             | +           | –           | –             | ++          | +           | –           |
| Nucleus tuberomamillaris (TM)              | ++            | –           | –             | –           | ±           | –             | +           | ±           | –           |
|  |               |             |               |             |             |               |             |             |             |
| <b>Andere Zelltypen</b>                    |               |             |               |             |             |               |             |             |             |
| Cellulae ependymales                       | ±             | +           | –             | +           | +           | –             | –           | ++          | +           |

**Tab. 20**

**Semi-quantitativer Vergleich der Signaldichte nukleärer STAT5-Immunreaktivität nach zentraler bzw. systemischer Leptingabe zu verschiedenen Zeitpunkten der Perfusion (30, 60, 90, 120, 150 und 240min). Die Signalfrequenz wurde mittels einer fünf-Punkte-Bewertungsskala ermittelt: +++ = hohe Signaldichte, ++ = mittlere Signaldichte, + = niedrige Signaldichte, ± = nur vereinzelte und – = keine nukleären Signale. Die Grundlage für die Benennung der Kerngebiete und Strukturen bildete der Rattengehirnatlas (Paxinos and Watson 1998).**

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der zentralen und der systemischen Leptin-Stimulation tabellarisch gegenübergestellt (Tab. 20). Es fiel auf, dass die meisten und intensivsten Signale nach der zentralen Applikation wesentlich früher (30min) als nach der peripheren Stimulation (120min) auftraten. Die ausgeprägten Signale im PaV und im Pe nach i.c.v.-Applikation waren nach peripherer Gabe nur vereinzelt oder gar nicht mehr vorhanden. Im ARC, SO und TM war die nukleäre STAT5-Translokation nach zentraler Stimulation mit mittlerer und nach der systemischen Applikation mit niedriger bis mittlerer Dichte vertreten. Im PMV und der RCH, welche 90min bzw. 150min nach der i.p.-Stimulation mit einer mittleren Dichte STAT5-positiver Zellen antworteten, kamen nach i.c.v.-Applikation Signale nur in einer niedrigen Dichte (PMV) bzw. gar nicht (RCH) vor. Der MCPO reagierte 30min nach der zentralen Stimulation mit geringer nukleärer STAT5-Translokation, nach der systemischen Leptingabe waren keine Zellen STAT5-reaktiv. Genau umgekehrt war es im VMPO und dem SCh der Fall.



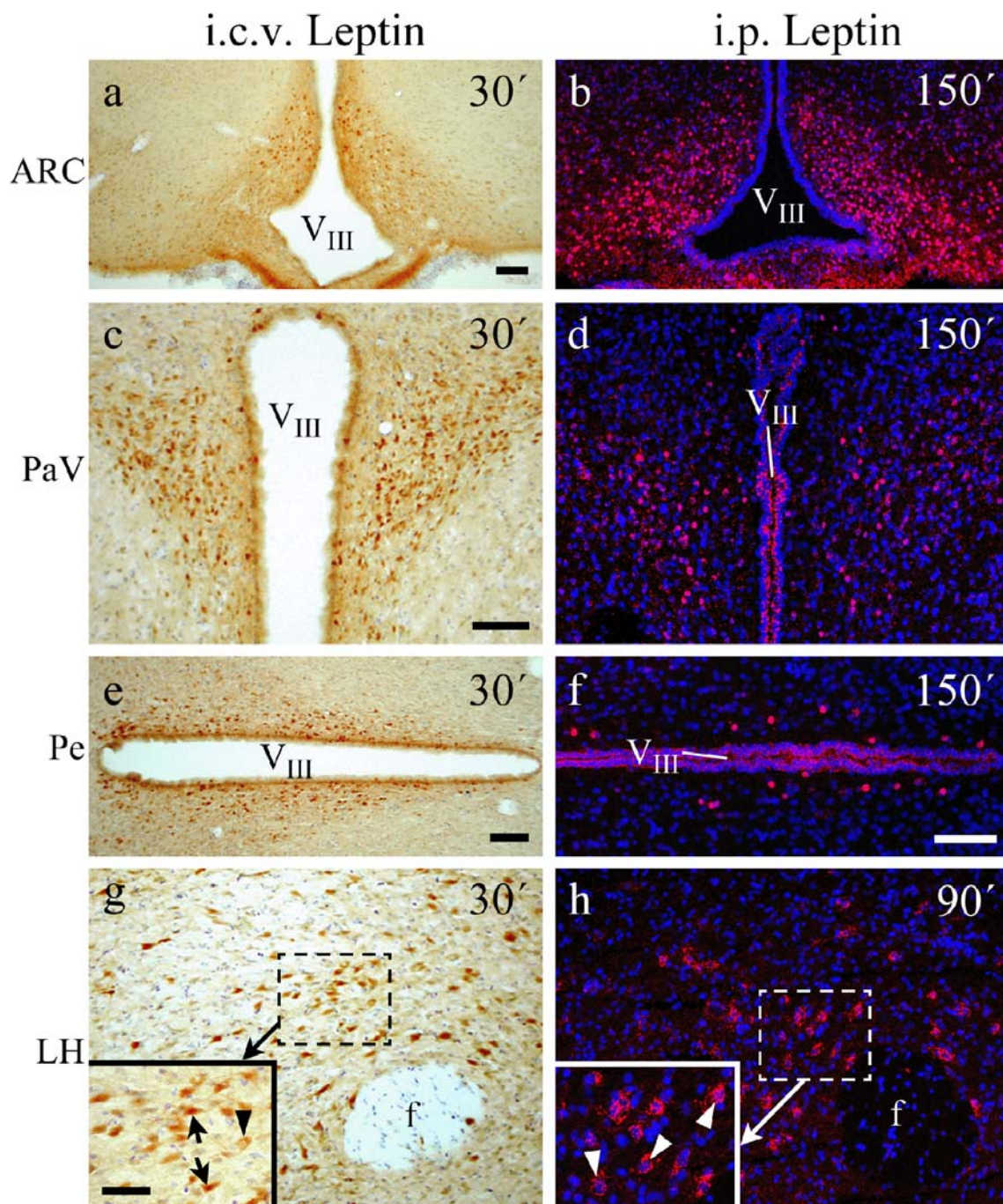


Abb. 51

Gegenüberstellung der nukleären STAT5-Translokation nach zentraler (links) und peripherer Leptin-Applikation (rechts). a, c, e und g: Einfachmarkierung (DAB) der STAT5-Moleküle 30min *post injectionem*. b, d, f und h: Doppelmarkierung von STAT5 (rot) und DAPI (blau) zu unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten (b, d und f = 150min, h = 90min). a und b: ARC mit nukleären STAT5-Signalen (links braun, rechts pink) nach i.c.v.-Applikation vor allem im ARC-D und nach i.p.-Gabe hauptsächlich im ARC-M und ARC-L. c und d: Nukleäre Signale im PaV in einer hohen Dichte nach i.c.v.- und mittlerer Dichte nach i.p.-Stimulation. e und f: Übersicht über den Pe mit nukleären STAT5-Signalen in einer hohen Dichte im Ausschnitt e und einer niedrigen Dichte im Bild f. Die meisten STAT5-positiven Zellen lagen nach i.c.v.-Stimulation im dorsalen (e) und nach i.p.-Gabe im ventralen Anteil (f) des Pe. Die beiden Bilder sind jeweils um 90° gedreht. g und h: LH mit überwiegend nukleären STAT5-Signalen nach i.c.v.-Applikation (Pfeile im Inset von g) und ausschließlich zytoplasmatischer Immunreaktivität nach i.p.-Stimulation (Pfeilköpfe im Inset von h). Eichbalken für a-f, g sowie h = 100µm und für die Insets in g sowie h = 50µm. Für b gilt der Eichbalken in a, für d, g und h gilt der in c, für f gilt der Eichbalken in e und für das Inset in h gilt der des Insets in g.



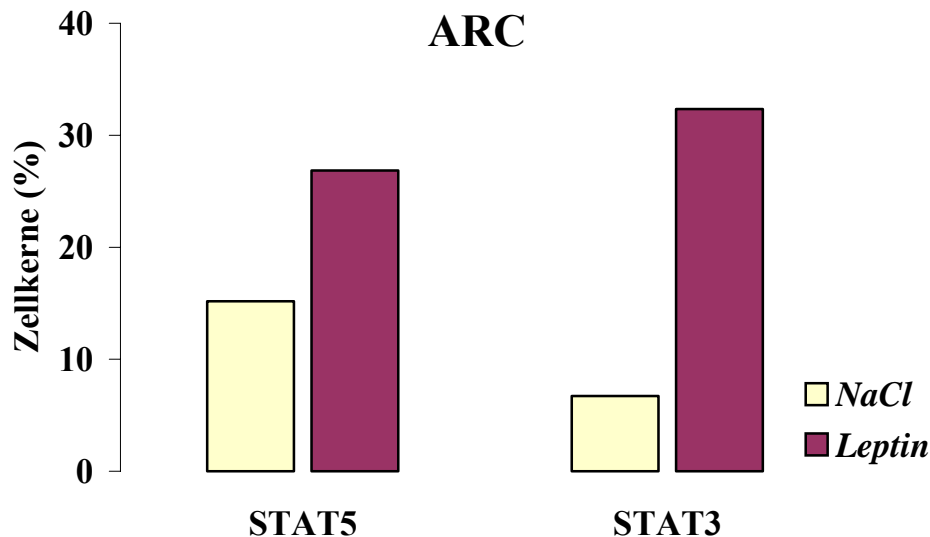
Hier war ausschließlich nach i.p.-Applikation eine geringe bis vereinzelte STAT5-Translokation detektierbar. Im Falle der Zellen des Ependyms waren nukleäre Signale bis zu einer mittleren Dichte nach der i.p.-Applikation und nur vereinzelte Signale nach zentraler Stimulation vertreten.

Für einige hypothalamische Kerngebiete sollen die Unterschiede zwischen der zentralen und der systemischen Applikation von Leptin in Form einer mikroskopischen Bildtafel (Abb. 51) verdeutlicht werden. Auf der linken Seite sind Ausschnitte des ARC, PaV, Pe und der LH mit DAB-gefärbter STAT5-Translokation (braune Punkte) und auf der rechten Seite die gleichen Strukturen, aber mit der Doppelmarkierung von STAT5 (rot) und DAPI (blau), gegenübergestellt. Die Übersichtsaufnahme (Abb. 51a und -b) zeigt die Verteilung der Signale im ARC 30min (-a) und 150min (-b) *post injectionem*. Nach zentraler Gabe konzentrierte sich die Translokation fast ausschließlich im ARC-D (3.2.1.1.), wobei sie nach systemischer Stimulation hauptsächlich im ARC-M und ARC-L (3.2.2.3.1.) vertreten war. Im PaV (Abb. 51c und -d) war nach zentraler Applikation (30min) eine höhere Dichte an nukleären Signalen als nach systemischer Gabe (150min) zu erkennen. Der Hauptanteil der STAT5-positiven Zellen lag bei beiden Tieren im ventromedialen Anteil des PaV. Bei der Gegenüberstellung des Pe (Abb. 51e und -f) fiel auf, dass zentral appliziertes Leptin 30min nach der Stimulation (-e) überwiegend im mittleren und dorsalen Anteil viele nukleäre STAT5-Signale induzierte, wohingegen die Verteilung der nukleären STAT5-Immunreaktivität 150min nach i.p.-Applikation (-f) mit sehr viel geringerer Dichte ihren Schwerpunkt im ventralen Anteil hatte. In der LH waren 30min nach der i.c.v.-Applikation (Abb. 51g) fast ausschließlich nukleäre Signale in einer hohen Dichte um die *Fornix* (f) herum zu finden. Interessanterweise kam aber nach i.p.-Stimulation (Abb. 51h) zu allen Perfusionszeitpunkten nur eine zytoplasmatische STAT5-Immunreaktivität vor. Deutlich wird dies durch die hohe Auflösung der Insets in Abb. 51g und -h. Die Pfeile markieren Zellen mit nukleärer Translokation, die Pfeilköpfe Zellen, in denen nur zytoplasmatische STAT5-Moleküle detektiert sind.

### **3.3. Quantitativer Vergleich der Leptin-induzierten nukleären STAT3- und STAT5-Translokation im ARC**

Die graphische Darstellung der quantitativen Auswertung der nukleären STAT5- bzw. STAT3-Signale anhand von Bildausschnitten des ARC von Leptin-stimulierten Ratten und von Kontrolltieren (Abb. 52) zeigte, dass ca. 27% aller DAPI-markierten Kerne mit einer

STAT5- und ca. 32% mit einer STAT3-Expression reagierten. Der wesentliche Unterschied lag aber darin, dass der Anteil der STAT5-exprimierenden Zellen 90min nach Leptingabe ca. 1,8mal höher war als bei den Kontrolltieren wohingegen der Faktor bei den STAT3-positiven Zellen bei ca. 4,8 lag.



**Abb. 52**

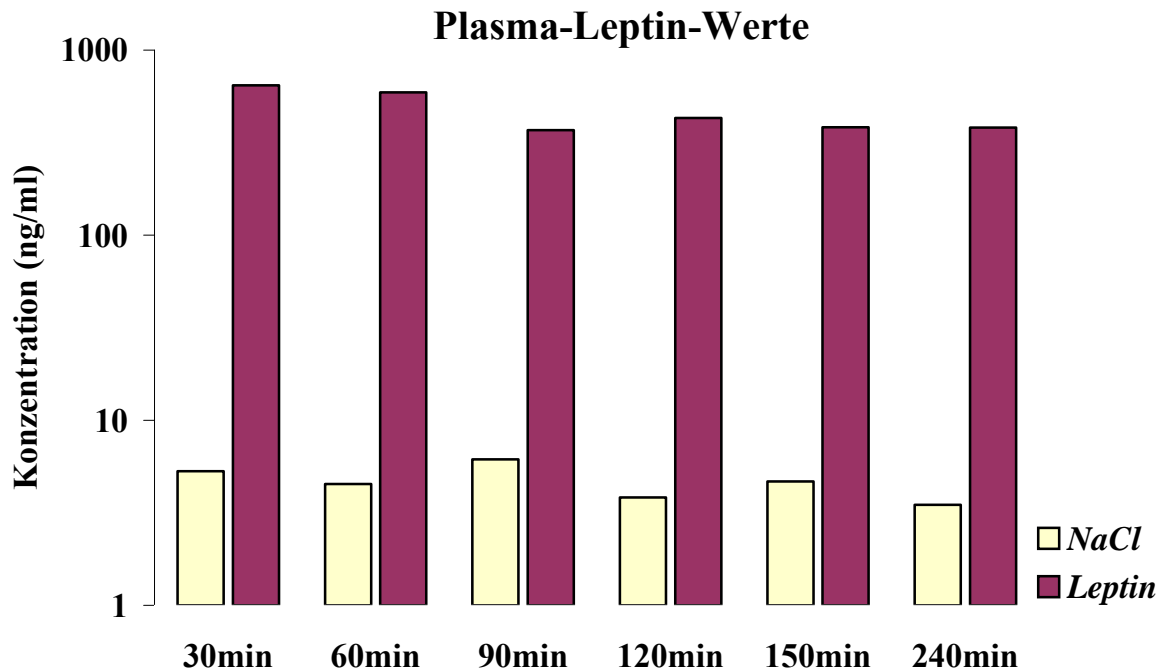
Graphische Gegenüberstellung der nukleären STAT5- (links) bzw. STAT3-Translokation (rechts) im ARC 90min nach systemischer Applikation von NaCl (gelbe Balken) und Leptin (rote Balken). Die Balken spiegeln den prozentualen Anteil der STAT5-positiven Kerne an allen DAPI markierten Kernen wieder.

### 3.4. Messung der Plasma-Zytokin-Konzentrationen nach systemischer Stimulation

#### 3.4.1. Messung der Leptin-Konzentrationen

Mit Messungen der Plasma-Leptin-Werte zum jeweiligen Zeitpunkt der Perfusion sollte überprüft werden, ob das i.p.-injizierte Leptin (5mg/kg KM) tatsächlich in den Blutkreislauf übertrat und damit auch im ZNS der Tiere zur Entfaltung seiner Wirkungen potenziell zur Verfügung stand. Dazu wurden die Plasma-Leptin-Werte aller Tiere eines Perfusionszeitpunktes arithmetisch gemittelt und graphisch dargestellt (Abb. 53). Die Leptin-Konzentrationen bei den Kontrolltieren lagen im Mittel zwischen 3,5 und 6,2ng/ml. Ab 30 bis 240min nach der Leptin-Applikation stiegen die Werte bis auf das 130fache der vergleichbaren Konzentrationen von NaCl-behandelten Ratten an. Es wurden bei keinem Tier Werte unter 266ng/ml gemessen, was immer noch ein Anstieg um das 40fache, verglichen mit

dem höchsten gemessenen Wert eines Kontrolltieres (6,7ng/ml), war. Bis 240min nach der Stimulation ließ sich kein deutlicher Abfall in der Plasma-Leptin-Konzentration erkennen.



**Abb. 53**

Vergleich der gemessenen Plasma-Leptin-Werte von Leptin- (rote Balken) und NaCl-behandelten Tieren. Die Graphik kombiniert sowohl Tiere für die STAT3- als auch für die STAT5-Detektion. Nach der Leptin-Applikation (5mg/kg KM) waren die Plasma-Werte bis zu 130fach höher als bei den zugehörigen Kontrolltieren. Sie konnten im Mittel Werte bis ca. 650ng/ml annehmen, wobei bei den Kontrolltieren im Mittel höchstens ca. 6,2ng/ml verzeichnet wurden.

### 3.4.2. Messung der IL-6-Konzentrationen

Mit Messungen der Plasma-IL-6-Werte zum jeweiligen Zeitpunkt der Perfusion sollte ausgeschlossen werden, dass die unter Leptingabe beobachtete nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Translokation durch das Zytokin IL-6 vermittelt war. Neben Leptin sind eine Reihe von anderen Zytokinen ebenfalls in der Lage, die Transkriptionsfaktoren STAT3 bzw. STAT5 zu aktivieren (1.6.2.1.). Im Falle des Transkriptionsfaktors STAT3 ist dies insbesondere für IL-6 bekannt (Hübschle et al. 2001, Harré et al. 2002, Harré et al. 2003). Bei der Messung des biologisch aktiven IL-6 wurden alle Tiere eines Perfusionszeitpunktes arithmetisch gemittelt und die Werte graphisch dargestellt (Abb. 54). Beim Vergleich der IL-6-Konzentrationen der Kontrolltiere mit denen nach Leptin-Behandlung zeigte sich, dass die IL-6-Konzentrationen nicht erhöht waren. Ab 30 bis 240min nach der Stimulation lagen alle Werte im Mittel zwischen 22 und 43 IU/ml wobei zwischen 60 und 150min *post injectionem* die

IL-6-Konzentration bei den Leptin stimulierten Tieren geringfügig höher war als unter Kontrollbedingungen (bis ca. 1,4fach). Diese überschritten jedoch nicht die basal auftretenden Konzentrationen.

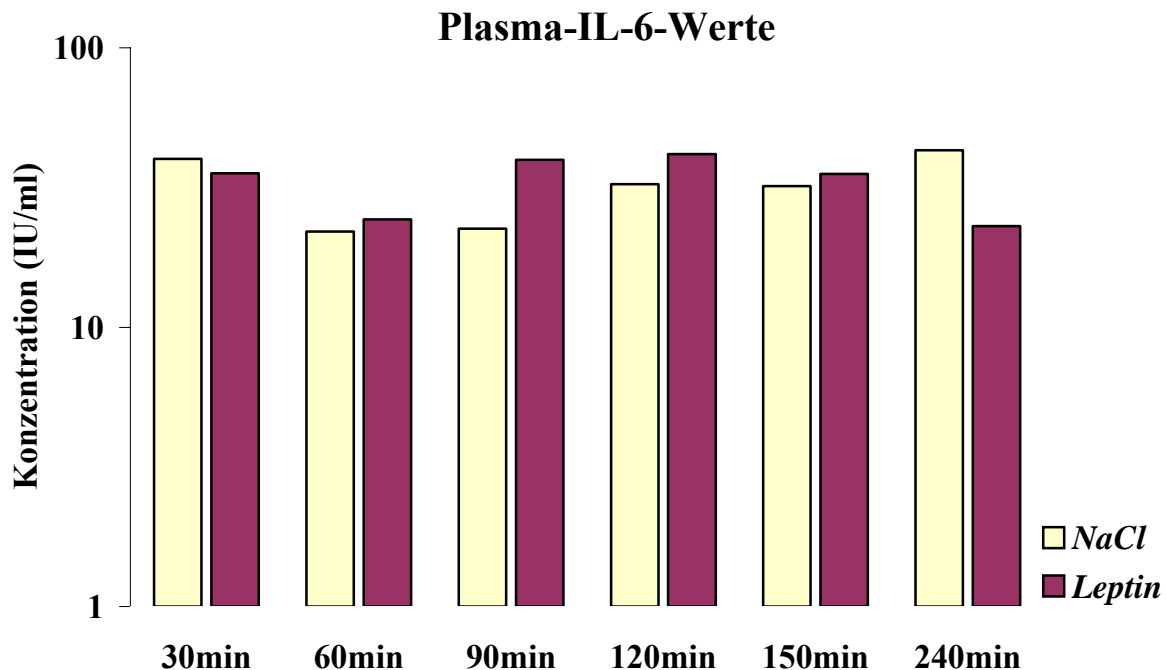


Abb. 54

Vergleich der gemessenen Plasma-IL-6-Werte von Leptin- (rote Balken) und NaCl-behandelten (gelbe Balken) Tieren. Die Graphik kombiniert sowohl Tiere für die STAT3- als auch für die STAT5-Detektion. Es lässt sich keine Plasma-IL-6-Konzentrationserhöhung erkennen.

#### 3.4.3. Messung der TNF-Konzentrationen

Mit Messungen der Plasma-TNF-Werte zum jeweiligen Zeitpunkt der Perfusion sollte ausgeschlossen werden, dass die unter Leptingabe beobachtete nukleäre STAT5- bzw. STAT3-Translokation durch TNF vermittelt war. Neben Leptin sind eine Reihe von anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren ebenfalls in der Lage, die Transkriptionsfaktoren STAT5 bzw. STAT3 zu aktivieren. Im Falle des Transkriptionsfaktors STAT5 ist dies insbesondere für TNF $\alpha$  beschrieben (Guo et al. 1998, Rizk et al. 2001, Miscia et al. 2002). Bei keiner der untersuchten Plasmaproben konnte eine erhöhte Konzentration an biologisch aktiven TNF gemessen werden. Sämtliche Werte lagen unter der Nachweisgrenze, die für den verwendeten Assay bei 6pg/ml lag (Ross et al. 2003).

### 3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Das umfangreiche Ergebnismaterial soll in diesem Kapitel noch einmal zusammengefasst dargestellt werden.

#### 1. STAT3 nach peripherer Leptin-Applikation

- Nach peripherer Leptin-Applikation (5mg/kg KM) konnte eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation in verschiedenen Strukturen des Gehirns der Ratte nachgewiesen werden. Der optimale Zeitpunkt der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation lag bei 90min *post stimulationem* und konnte in folgenden Kerngebieten nachgewiesen werden: im medialen und lateralen Anteil des ARC, im DMH, im dorsomedialen Subkern des VMH, im PMV, in der RCH, in der PAA und im Sol.
- Die quantitative Auswertung der STAT3-positiven Zellkerne an allen DAPI-markierten Zellkernen ergab am Beispiel des sehr gut reagierenden ARC einen fast 5fach höheren Wert als bei den vergleichbaren Kontrolltieren.
- Durch Kolokalisationsstudien konnte in verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase beteiligt sind, eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation eindeutig in Neuronen nachgewiesen werden. Solche Kerngebiete sind der mediale und laterale Anteil des ARC, der DMH, der dorsomediale Subkern des VMH, die RCH und der PMV.
- Neben Neuronen reagierten auch einige Endothelzellen mit einer Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation, die zwischen 60 und 120min nach der Stimulation am stärksten ausgeprägt war.
- Weitere STAT3-positive Zellkerne konnten nach Leptin-Stimulation im PC der V<sub>1</sub> detektiert werden. Sie traten vor allem zwischen 90 und 120min *post injectionem* auf.
- Durch Zytokin-Messungen im Plasma der Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt der Perfusion wurde keine Erhöhung der IL-6- und der TNF-Werte in den Leptin-stimulierten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt. Die Leptin-Spiegel waren jedoch bis zu 130fach höher als bei den vergleichbaren Kontrolltieren.

## 2. STAT5 nach zentraler Leptin-Applikation

- Nach zentraler Applikation von Leptin (3,5µg/Tier) konnte eine Leptin-induzierte STAT5-Translokation ebenfalls in verschiedenen, an der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase beteiligten, hypothalamischen Kerngebieten detektiert werden. Die meisten Signale waren 30min nach der Stimulation zu erkennen und traten vor allem im parvozellulären Subkern des PaV, im Pe, im PMV sowie im SO auf. In den klassischen hypothalamischen Leptin-Zielstrukturen, wie ARC, DMH und VMH war im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Leptin-induzierte STAT5-Aktivierung zu verzeichnen.

## 3. STAT5 nach systemischer Leptin-Applikation

- Nach peripherer Leptin-Applikation (5mg/kg KM) konnte eine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation in verschiedenen Strukturen des Gehirns der Ratte nachgewiesen werden. Der optimale Zeitpunkt der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation lag bei 120min (für die RCH bei 150min) *post stimulationem* und konnte in folgenden Kerngebieten nachgewiesen werden: in allen Anteilen des ARC, im PMV, in der RCH, im SO und im TM.
- Durch Kolokalisationsstudien konnte in verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase beteiligt sind, eine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation eindeutig in Neuronen nachgewiesen werden. Solche Kerngebiete sind der ARC, der PMV, die RCH, der SO und der TM.
- Die quantitative Auswertung der STAT5-positiven an allen DAPI-markierten Zellkernen ergab am Beispiel des sehr gut reagierenden ARC, im Gegensatz zu STAT3 (fast 5fach höherer Wert), einen nur knapp um das Doppelte höheren Wert als bei den vergleichbaren Kontrolltieren. Der neuronale Ursprung STAT5-positiver Zellkerne war außer im ARC (ca. 80%) im PMV, in der RCH, im SO und im TM mit über 90% der STAT5-positiven Kerne sehr hoch.
- Neben Neuronen konnten teilweise auch STAT5-positive Zellkerne nicht neuronaler Zellen, besonders im ARC, detektiert werden. Durch Kolokalisationsstudien mit dem Astrozyten-spezifischen Marker GFAP konnten vereinzelte STAT5-positive Astrozyten im ARC nachgewiesen werden. In anderen Kerngebieten gab es keine Kolokalisationen mit GFAP.

- Weiterhin konnten STAT5-aktivierte Zellkerne im Ependym des V<sub>III</sub> vor allem 150min nach der Leptin-Stimulation detektiert werden.
- Durch Zytokin-Messungen im Plasma der Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt der Perfusion wurde keine Erhöhung der IL-6- und der TNF-Werte in den Leptin-stimulierten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt. Die Leptin-Spiegel waren jedoch bis zu 130fach höher als bei den vergleichbaren Kontrolltieren.



## **4. KAPITEL**

### **Diskussion**

Im Vorfeld der Diskussion soll darauf hingewiesen werden, dass im Rahmen dieser umfassenden neuroanatomischen Studie das Hauptgewicht der Diskussion ebenfalls neuroanatomisch ausgerichtet ist. Die ermittelten hypothalamischen Leptin-Zielstrukturen mit STAT3- bzw. STAT5-abhängiger Signaltransduktion werden daher kerngebiets- und zellspezifisch auf ihre potenzielle physiologische Funktion hin diskutiert.

#### **4.1. Überlegungen zur Methodik**

##### ***4.1.1. Wahl des Injektionsweges für die Leptin-Applikation***

Um aussagekräftige und physiologisch relevante Ergebnisse bei der Kartierung von Leptin-Zielstrukturen im *Hypothalamus* der Ratte zu erzielen, ist die Wahl des Injektionsweges für Leptin von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit wurde für die STAT3- und STAT5-Detektion die i.p.- und zusätzlich für die STAT5-Detektion die i.c.v.-Injektion von Leptin gewählt. Es gibt zwei Hauptgründe, die für eine systemische Applikation sprechen.

Der erste Grund beruht darauf, dass die periphere Injektion im Gegensatz zur zentralen Applikation die physiologische Situation sehr viel besser widerspiegelt. Das aus der Bauchhöhle resorbierte Leptin erreicht ebenso wie das auf natürlichem Wege im weißen Fettgewebe synthetisierte Leptin das Gehirn über den Blutweg, wohingegen zentral appliziertes Leptin artifiziell aus dem Ventrikelraum ins Hirngewebe diffundiert. Dieser Weg spielt physiologischerweise keine Rolle (1.5.) und dient somit nur zur Nachahmung sehr hoher Gehirn-intrinsischer Leptin-Konzentrationen. Im Unterschied dazu kann das i.p.-applizierte Leptin auf demselben Weg wie physiologisch zirkulierendes Leptin dieselben Zellen und Zielstrukturen im ZNS erreichen und aktivieren.

Ein zweiter und nicht minder wichtiger Grund, der für eine periphere Applikation spricht, ist die Tatsache, dass möglicherweise allein der mechanische Stimulus bei der Bolus-Applikation in den V<sub>1</sub> die Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann. Im Falle von STAT3 scheint dieses Phänomen weniger ausgeprägt zu sein, da bei den Kontrolltieren, die den gleichen mechanischen Stimulus bei der zentralen Applikation von Leptin erfahren haben, die Ausprägung der nukleären STAT3-Translokation in Zellen des ZNS so gut wie

nicht vorhanden war (Hübschle et al. 2001). Bei der STAT5-Translokation allerdings scheint dieser Applikationsweg einen starken Einfluss zu haben. Wie in Tab. 18 ersichtlich ist, unterschied sich die semi-quantitative Bewertung der STAT5-Signale nach Leptin- und nach NaCl-Behandlung kaum. Dies lässt vermuten, dass der Transkriptionsfaktor STAT5 schon durch unspezifische (mechanische) Stimuli aktiviert werden kann. Aus diesem Grund bin ich im Sinne der zu bearbeiteten Fragestellung recht schnell zur systemischen Leptin-Applikation übergegangen.

#### **4.1.2. Wahl des Markers für Leptin-aktivierte Zellen im ZNS**

Neben der Wahl des physiologisch relevanten Applikationswegs ist auch die Wahl eines optimalen Markers für Leptin-Zielstrukturen von Bedeutung. So stellt sich die Frage, ob die Markierung von STAT-Faktoren eine mögliche Methode ist, Leptin-responsive Zellen im Gehirn der Ratte zu detektieren. In der Vergangenheit wurden viele Studien durchgeführt um potenzielle Leptin-responsive Zellen zu identifizieren und zu lokalisieren. So wurden Leptin-Rezeptor-exprimierende Zellen im Gehirn durch *in situ Hybridisierung* (Guan et al. 1997, Elmquist et al. 1998a) oder immunhistochemisch durch Verwendung von Ak, die gegen die Rezeptor-Subtypen gerichtet waren, (Hakansson et al. 1998, Baskin et al. 1999c) detektiert. Diese Verfahren lassen aber keinen Rückschluss auf eine Aktivierung der Zellen zu, da auch inaktive Rezeptoren detektiert wurden. Leptin-induzierte Effekte auf die Nahrungsaufnahme und Energie-Homöostase werden wahrscheinlich durch die Ob-Rb-aktivierte JAK-STAT-Signalkaskade vermittelt. Somit ist allein die Expression des langen Rezeptors von Bedeutung, da dieser wahrscheinlich aufgrund seiner langen intrazellulären Domäne als einziger Vertreter in der Lage ist, die JAK-STAT-Kaskade zu aktivieren (Lee et al. 1996). Diese rein morphologische Kartierung potenzieller Leptin-responsiver Zellen sagt aber nichts über deren tatsächliche Aktivierung aus, insbesondere im Hinblick auf die Auslösung der Transkription von Zielgenen. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, muss ein Faktor aus der Signalkaskade verwendet werden, welcher nach der Aktivierung des Leptin-Rezeptors an der Zellmembran die Gen-Transkription im Zellkern vermittelt. Die sogenannten STAT-Faktoren, unter anderem STAT3, welche hauptsächlich durch Leptin im *Hypothalamus* aktiviert werden (Vaisse et al. 1996, McCowen et al. 1998, Meister 2000) stellen solche Transkriptionsfaktoren dar. Durch ihre Detektion können sämtliche, durch Leptin aktivierte Zellen, gleich welchen Phänotyps, erkannt und durch immunhistochemische Verfahren einer genauen Kartierung im Gehirn unterzogen werden. Bisher ist die Verteilung der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation im Gehirn der Ratte neben einer zentralen

(Hübschle et al. 2001, Ladyman and Grattan 2004) auch nach systemischer Applikation von Leptin (Münzberg et al. 2003) untersucht worden. Die zentrale Applikation entspricht nicht dem physiologischen Weg von Leptin ins Gehirn und somit können hierdurch nur eingeschränkte Aussagen über die Lokalisation von Leptin-Zielstrukturen aufgestellt werden. Vergleicht man die Verteilung der i.c.v.- und i.p.-Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation mit der Verteilung von Ob-Rb im *Hypothalamus* der Ratte (Tab. 21), erkennt man zumindest bei der zentralen Applikation eine weitgehende Übereinstimmung.

| hypothalamische Kerngebiete      | Ob-Rb-Expression | nukleäre STAT3-Expression<br>zentrale Leptin-Applikation | nukleäre STAT3-Expression<br>systemische Leptin-Applikation |
|----------------------------------|------------------|--|---|
| ARC                              | +++              | +++  | positiv   |
| DMH<br>(caudale Region)          | +++              | +++  | positiv   |
| VMH<br>(dorsomedialer Subkern)   | +++              | +++  | positiv   |
| Pe                               | +++              | ++   | –   |
| PMV                              | +++              | +  | –   |
| LH                               | ++               | ++   | positiv   |
| PH                               | ++               | ++   | –   |
| RCH                              | ++               | ++   | –   |
| PaV<br>(parvozellulärer Subkern) | +                | ++   | positiv   |
| SO                               | +                | –  | –   |

Tab. 21

**Gegenüberstellung einiger hypothalamischer Kerngebiete, die einerseits die lange Form der Leptin-Rezeptoren exprimieren und andererseits mit einer STAT3-Translokation nach zentraler bzw. systemischer Leptin-Applikation reagieren (Elmqvist et al. 1998a, Baskin et al. 1999c, Hübschle et al. 2001, Münzberg et al. 2003). Die Bewertung der Expression wurde hier mittels einer semiquantitativen Bewertungsskala durchgeführt: +++ = starke, ++ = mittelstarke und + = schwache Expression. In den Studien von Baskin und Kollegen (1999) sowie Münzberg und Kollegen (2003) wurde keine quantitative Bewertung der Verteilung von Ob-Rb bzw. STAT3 durchgeführt.**

Geringe Unterschiede in der Verteilung sind trotzdem zu erkennen. So konnten Hübschle und Kollegen (2001) im Pe und im PMV trotz hoher Ob-Rb-Dichte nur eine geringe bis moderate sowie im PaV bei geringer Dichte der langen Leptin-Rezeptoren eine moderate nukleäre STAT3-Translokation nachweisen. Eine relativ geringe Aussagekraft bezüglich der Übereinstimmung der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation mit der Verteilung von Ob-Rb ist der Studie von Münzberg und Kollegen (2003) zuzuschreiben. Die Verteilung der STAT3-Signale wurde hier nicht quantitativ bestimmt, so dass die Signaldichte nur subjektiv bewertet werden konnte. Zusätzlich wiesen diese Autoren nukleäre STAT3-Signale mittels eines anti-phospho-STAT3-Ak nach, der nur die phosphorylierte Form der STAT3-

Faktoren detektierte (Münzberg et al. 2003). Sie schlossen auf eine nukleäre Lokalisation der induzierten Signale unter der Annahme, dass phosphorylierte STAT3-Faktoren ausschließlich im Kern vorkommen würden, was aber nicht der Fall ist (1.6.2.1.). Ebenso wurde in dieser Studie eine Markierung der STAT3-Translokation mittels der DAB-Färbung durchgeführt, wodurch nur ein sehr eingeschränkter Nachweis über eine nukleäre Translokation geführt werden kann. Dementsprechend ist es möglich, dass hier zytoplasmatische STAT3-Signale als nukleäre Translokation identifiziert wurden. Dieses Problem wurde in der hier vorliegenden Arbeit mittels DAPI-Färbung experimentell besser gelöst. Hinzu kommt die Tatsache, dass die Gehirne schon 45min nach der Stimulation analysiert wurden, so dass möglicherweise potenzielle Leptin-Zielstrukturen (Ob-Rb-positiv) übersehen wurden. Meine Ergebnisse deuten auf eine maximale STAT3-Expression im PMV 90min *post stimulationem* hin (3.1.1.). Aus diesen Gründen muss die Kartierung der durch systemische Leptin-Applikation induzierten nukleären STAT3-Translokation im ZNS der Ratte eingehender untersucht werden.

Eine Leptin-induzierte Aktivierung von STAT5 wurde bisher nur in peripheren Geweben nachgewiesen (Morton et al. 1998, Briscoe et al. 2001, Goiot et al. 2001, Carnevali et al. 2003). Somit stellen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur STAT5-Aktivierung im ZNS die ersten Untersuchungen dieser Art dar.

#### ***4.1.2.1. Alternative Möglichkeiten zur Detektion Leptin-aktivierter Zellen***

Insgesamt stellt die Detektion von STAT-Transkriptionsfaktoren zu Erörterung der Fragestellungen dieser wissenschaftlichen Arbeit eine sehr gute Methode dar. Es stellt sich jedoch die Frage, ob es auch alternative Möglichkeiten gibt, um die hier untersuchten Fragestellungen adäquat beantworten zu können.

Alternativ zur Detektion der STAT-Faktoren können zu dem gleichen Zweck auch STAT-induzierte Gen-Produkte detektiert werden. Dazu gehören im Falle von STAT3 z.B. FOS (Elmqvist et al. 1997, Elmqvist et al. 1998b, Banks et al. 2000, Elias et al. 2000) und SOCS-3 (Bjorbaek et al. 1998a, Elias et al. 1999). FOS allerdings gilt als ein Neuronen-spezifischer Transkriptionsfaktor, der nur eine Detektion aktivierter Neurone zulässt. So konnten mehrere immunhistochemische Studien sowohl nach zentraler (Elmqvist et al. 1997, Elmqvist et al. 1998b, Elias et al. 2000) als auch nach systemischer (Van Dijk et al. 1996) Applikation von Leptin eine FOS-Aktivierung in Neuronen des ZNS nachweisen. Vergleicht man aber die Verteilung der langen Leptin-Rezeptoren (1.10.) mit der Leptin-induzierten FOS-Aktivierung (1.11.) im *Hypothalamus* der Ratte, stellt man in einigen Kerngebieten Diskrepanzen fest

(Tab. 22). Elmquist und Kollegen (1998) konnten im ARC moderate FOS-Signale im lateralen Anteil trotz hoher Ob-Rb-Dichte erkennen, wohingegen im medialen Subkern des ARC, wo der Ob-Rb ebenfalls stark vertreten ist, keinerlei FOS-Signale zu verzeichnen waren. Weitere Unterschiede bestehen im PMV und der RCH, wo in mittlerer bis hoher Dichte Ob-Rb vorkommt, aber nur eine geringe FOS-Expression detektiert werden konnte. In der LH, im Pe und im PH konnte trotz mittlerer bis hoher Ob-Rb-Dichte keine Leptin-induzierte FOS-Aktivierung nachgewiesen werden.

| hypothalamische Kerngebiete            | Ob-Rb-Expression           | nukleäre FOS-Expression nach systemischer Leptin-Applikation |
|--|----------------------------|--|
| DMH ( <i>caudale Region</i> )          | +++                        | +++  |
| VMH ( <i>dorsomedialer Subkern</i> )   | +++                        | +++  |
| ARC                                    | ( <i>lateral Subkern</i> ) | ++   |
|  | ( <i>medial Subkern</i> )  | –  |
| Pe                                     | +++                        | –  |
| PMV                                    | +++                        | +  |
| LH                                     | ++                         | –  |
| PH                                     | ++                         | –  |
| RCH                                    | ++                         | +  |
| PaV ( <i>parvozellulärer Subkern</i> ) | +                          | +  |

**Tab. 22**

**Gegenüberstellung der Leptin-induzierten nukleären FOS-Expression nach systemischer Applikation und der Verteilung der funktionellen Leptin-Rezeptoren in hypothalamischen Kerngebieten der Ratte (Elmquist et al. 1998a, Elias et al. 2000).**

Aufgrund dessen muss die Frage gestellt werden, ob tatsächlich alle direkt Leptin-responsiven Zellen im *Hypothalamus* der Ratte durch eine Detektion von FOS erfasst werden können. Am Beispiel des ARC sieht man, dass Neurone, auf die Leptin inhibitorisch wirkt (NPY/AgRP-synthetisierende Neurone im medialen Anteil), nicht mit einer FOS-Expression reagieren, trotz einer eindeutig bestehenden Leptin-Responsivität. Hübschle und Kollegen (2001) konnten durch eine immunhistochemische Koloalisationsstudie beweisen, dass in hypothalamischen Kerngebieten 60min nach zentraler Applikation bei weitem nicht alle Leptin-induzierten STAT3-Signale mit der FOS-Immunreaktivität koloalisiert sind. Zudem waren intensive nukleäre STAT3-Signale in allen ARC-Subkernen vorhanden (Hübschle et al. 2001). Die Diskrepanzen zwischen STAT3- und FOS-positiven Neuronen kommen dadurch zustande, dass die Expression von FOS neben dem JAK-STAT-Signalweg auch durch andere Signalwege wie z.B. den MAPK/ERK-Weg aktiviert werden kann (Banks et al. 2000) (1.6.2.). FOS scheint also kein universeller Aktivitäts-Marker für die Leptin-Wirkung im ZNS zu sein, da nur die neuronale Aktivität detektiert wird.

Die Analyse der Aktivierung von SOCS-3 im Gehirn nach systemischer Leptin-Applikation stellt einen weiteren alternativen Ansatz dar, die Leptin-induzierte Aktivierung in Zellen des ZNS zu untersuchen. Sie wurde als erste neuroanatomische Methode eingesetzt, Leptin-responsive Neurone direkt zu identifizieren (Bjorbaek et al. 1998a, Elias et al. 1999). Wie in 1.6.2. beschrieben, ist die SOCS-3-Expression von der Aktivierung der STAT3- und auch der STAT5-Faktoren abhängig. Die Produktion von SOCS-3 wiederum hemmt die STAT3- bzw. STAT5-Phosphorylierung und bildet somit einen negativen autoregulatorischen Feedback-Mechanismus auf seine eigene Genexpression. Die Tatsache, dass Leptin-induzierte nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Aktivierungen nach ihrem Maximum (90 bzw. 120min, 3.1. bzw. 3.2.2.), trotz gleichbleibender zirkulierender Leptin-Konzentrationen (Abb. 53) wieder abnehmen, spricht für eine SOCS-3-vermittelte Unterdrückung der detektierten nukleären STAT3- bzw. STAT5-Signale. Die nukleäre STAT3-Translokation stimmte nach zentraler Applikation von Leptin mit der SOCS-3-mRNA-Expression überein, unabhängig davon, ob eine Leptin-induzierte Inhibition oder Stimulation von Nervenzellen vorlag (Hübschle et al. 2001). Somit stellt die Detektion der SOCS-3-mRNA eine echte Alternative zur Kartierung von Leptin-Wirkungen auf das ZNS dar.

#### ***4.1.3. Problem der STAT-Markierung in Endothelzellen***

Neben der Wahl des physiologisch relevanten Injektionswegs und eines repräsentativen Markers zur Detektion von Leptin-Zielstrukturen stellt sich die Frage, ob die angewendete Methode der Immunhistochemie tatsächlich alle nukleären STAT-Signale vollständig erkennt. Bei der „free-floating-Methode“ und auch in anderen immunhistochemischen Studien wurde eine Fixation mittels 4%iger PFA-Lösung direkt während der Perfusion (2.5.2.) durchgeführt. Mit dieser Methode konnten bisher keine nukleären STAT3-Signale in Endothelzellen im ZNS der Ratte nach zentraler (Hübschle et al. 2001) und im ZNS der Maus nach systemischer Leptin-Applikation (Hosoi et al. 2002) gefunden werden. Durch den Einsatz einer abgeschwächten Fixations-Methode an frischen Gehirnschnitten mittels 2%iger PFA-Lösung (Rummel et al. 2005) konnte schließlich eine Änderung des Verteilungsmusters an markierten Signalen nach Lipopolysaccharid-Stimulation festgestellt werden. Interessanterweise war jetzt eine zusätzliche nukleäre STAT3-Translokation im Endothel einiger Blutgefäße, verteilt über das ganze Rattengehirn, nachweisbar. Im Perfusions-fixierten Gehirn scheinen STAT3-Signale in Endothelzellen, welche besonders dem Kontakt mit der Fixierungslösung ausgesetzt sind, durch eine Überfixierung nicht markiert werden zu können. Die Perfusions-

Fixierung könnte die Epitope in den Gehirn-Endothelzellen maskieren, während die modifizierte Methode mit Immersionsfixierung in der Lage ist, diese zu detektieren.

## 4.2. Die STAT-Kartierung

### 4.2.1. Überlegungen zur Spezifität der nukleären STAT-Translokation

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die im Rahmen dieser Arbeit dokumentierten nukleären STAT-Signale tatsächlich alle Leptin-induziert sind. STAT-Faktoren sind durch eine Reihe von Rezeptoren verschiedener Zytokine und Hormone aktivierbar. Der Nachweis einer nukleären STAT-Translokation ist somit nicht Leptin-spezifisch. Neben Leptin können sowohl STAT3 als auch STAT5 unter anderem durch Zytokine der gp130-Familie (z.B. IL-6), TNF $\alpha$ , Interferone, Wachstumsfaktoren, Prolaktin, GH, Erythropoetin und Thrombopoetin aktiviert werden (1.6.2.1.1. und 1.6.2.1.2.) (Grimley et al. 1999, Rizk et al. 2001, Paukku and Silvennoinen 2004). Verschiedene immunhistochemische Studien konnten zeigen, dass besonders IL-6 eine massive STAT3-Translokation im ZNS der Ratte, z.T. auch in Endothel-Zellen, auslösen kann (Hübschle et al. 2001, Harré et al. 2002, Harré et al. 2003, Ni et al. 2004). Hinweise darauf, dass die detektierten nukleären STAT-Signale in der vorliegenden Arbeit beispielsweise nicht durch IL-6 induziert sind, vermittelt das unterschiedliche Verteilungsmuster der IL-6- und der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Signale im ZNS der Ratte.

| hypothalamische Kerngebiete | Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Expression<br><i>nach systemischer Applikation</i> | IL-6-induzierte nukleäre STAT3-Expression<br><i>nach zentraler Applikation</i> |
|-----------------------------|---|--|
| ARC                         | +++   | +  |
| VMH                         | +++   | +  |
| DMH                         | ++  | +  |
| PAA                         | ++  | +++  |
| PMV                         | ++  | –  |
| RCH                         | ++  | ++   |

**Tab. 23**

**Gegenüberstellung der durch periphere Leptin-Injektion (3.1.1.) und durch zentrale IL-6-Applikation (Hübschle et al. 2001) induzierte nukleäre STAT3-Expression in hypothalamischen Kerngebieten der Ratte zum jeweils optimalen Perfusions-Zeitpunkt.**

Hübschle und Kollegen (2001) konnten durch eine zentrale IL-6-Injektion zeigen, dass IL-6-induzierte nukleäre STAT3-Signale vor allem im rostralen *Hypothalamus* vorkamen,



wohingegen eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation nach zentraler Applikation hauptsächlich im ventrobasalen *Hypothalamus* auftrat (Hübschle et al. 2001). Es fällt auf, dass hypothalamische Kerngebiete, die mit einer starken Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation reagierten, nur geringe bis moderate IL-6-induzierte nukleäre STAT3-Signale aufwiesen. Ausgenommen sind solche Strukturen, die direkt mit der applizierten Substanz in Verbindung gekommen sind, wie z.B. das Ependym der Ventrikel. Ebenso entspricht auch nach peripherer Gabe die Verteilung der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation (3.1.1.) nicht dem Verteilungsmuster von IL-6 (Tab. 23).

Ein Beweis für eine IL-6-unabhängige nukleäre STAT3-Translokation ist die im Rahmen der vorliegenden Versuche durchgeführte Messung der Plasma-Konzentration an IL-6 mittels eines Bioassays zum jeweiligen Zeitpunkt der Perfusion (3.4.2.). Zu keinem Zeitpunkt überstiegen die IL-6-Werte der Leptin-behandelten Tiere die basal auftretenden Konzentrationen dieses Zytokins. Aufgrund des abweichenden Verteilungsmusters der Leptin- von der IL-6-induzierten nukleären STAT3-Translokation im ZNS sowie aufgrund der niedrigen Plasma-IL-6-Werte kann davon ausgegangen werden, dass die nukleären STAT3-Signale in dieser Arbeit nicht IL-6-vermittelt waren.

Ein Nachweis für eine IL-6- oder Leptin-induzierte STAT5-Translokation im ZNS wurde bisher noch nicht geführt. Somit kann kein spezifisches Verteilungsmuster als Kriterium für eine Leptin-induzierte STAT5-Translokation herangezogen werden.

Ein weiteres Zytokin, welches eine nukleäre STAT-Translokation hervorrufen kann, ist TNF $\alpha$ . Es wird ebenso wie IL-6 z.B. bei inflammatorischen Prozessen vermehrt synthetisiert. Eine Studie hat gezeigt, dass systemisch appliziertes TNF $\alpha$  im *Hypothalamus* der Ratte eine Aktivierung von STAT3 und STAT5 stimulieren und eine Leptin-induzierte STAT3-Tyrosin-Phosphorylierung potenzieren kann (Rizk et al. 2001). Deshalb sollte eine TNF $\alpha$ -induzierte Translokation nukleärer STAT3- bzw. STAT5-Faktoren in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Ein spezifisches Verteilungsmuster der TNF $\alpha$ -induzierten nukleären STAT-Translokation kann nicht als Beweis herangezogen werden, da bisher keine neuroanatomischen Studien über eine TNF $\alpha$ -induzierte nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Translokation durchgeführt wurden. Jedoch sollte eine Beteiligung von TNF an der STAT3- bzw. STAT5-Aktivierung mittels Bestimmungen der Plasma-TNF-Werte (3.4.3.) untersucht werden. Zu keinem Perfusionszeitpunkt konnten erhöhte TNF-Konzentrationen im Plasma der Leptin-behandelten Tiere gemessen werden. Somit sollte eine Beteiligung von TNF an der Expression der Leptin-induzierten nukleären STAT3- bzw. STAT5-Signale auszuschließen sein.

Für alle anderen STAT3- bzw. STAT5-induzierenden Zytokine (siehe oben) wurde eine Beteiligung an den Leptin-induzierten Signalen nicht explizit ausgeschlossen. Wir können also einen Beitrag dieser Faktoren nicht zweifelsfrei ausschließen. Allerdings liegt es nahe, dass bei basalen IL-6- und TNF-Konzentrationen nach der Leptin-Stimulation die Plasma-Konzentration anderer Zytokine ebenfalls nicht erhöht waren, um die Expression von STAT3 und STAT5 zu beeinflussen.

Zudem kann auch deshalb von einer nahezu ausschließlich Leptin-induzierten nukleären Translokation von STAT3 bzw. STAT5 ausgegangen werden, da die Plasma-Leptin-Spiegel nach systemischer Leptin-Stimulation (3.4.1.) um ein Vielfaches höher waren als bei den vergleichbaren Kontrolltieren. Die Verteilung der nukleären STAT3-Signale in den für Leptin wichtigsten hypothalamischen Kerngebieten ARC, VMH und DMH, die auch z.B. in der Maus sehr gut auf systemisch appliziertes Leptin reagieren (Hosoi et al. 2002, Münzberg et al. 2004), entsprach weitgehend dem Verteilungsmuster der Leptin-induzierten Signale nach zentraler (Hübschle et al. 2001, Ladyman and Grattan 2004) (Tab. 24) und nach systemischer Applikation (Münzberg et al. 2003).

#### **4.2.2. STAT3**

Trotz einer groben Übereinstimmung des in dieser Arbeit nachgewiesenen Verteilungsmusters der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation nach peripherer Applikation mit dem nach zentraler Leptingabe bestehen bei genauerer Betrachtung dennoch einige Unterschiede. Erstens traten die meisten nukleären Signale bei systemischer Applikation nach 90min (3.1.1.) und bei zentraler Applikation bereits nach 30min auf (Hübschle et al. 2001). Dies hängt vor allem damit zusammen, dass i.p.-appliziertes Leptin erst aus der Bauchhöhle ins Blut resorbiert werden musste, bevor es von dort ins Hirngewebe übergehen konnte, wohingegen i.c.v.-appliziertes Leptin direkt aus dem Ventrikelraum ins Gewebe diffundieren konnte. Somit war die Kinetik bei den beiden Applikationswegen völlig unterschiedlich. Hosoi und Kollegen (2002) stellten in ihrer Studie an der Maus allerdings ebenfalls eine maximale STAT3-Translokation zum Zeitpunkt 30min nach systemischer Applikation (5ml/kg KM) fest (Hosoi et al. 2002). Dies kann als Beweis für die tierartlichen Unterschiede angesehen werden und bestätigt, dass diese Ergebnisse nur eingeschränkt auf eine andere Tierart übertragbar sind.

Zweitens reagierten offensichtlich unterschiedliche hypothalamische Kerngebiete mit einer nukleären STAT3-Translokation auf die verschiedenen Applikationsformen von Leptin (Tab. 24). So kamen im PaV, Pe und PH nach zentraler Applikation geringe bis moderate und nach

systemischer Gabe keine Leptin-induzierten STAT3-Signale vor. In der LH waren die zentral vermittelten STAT3-Signale vor allem nukleären Ursprungs, wohingegen bei der systemischen Stimulation ausschließlich zytoplasmatische Signale detektiert wurden. Diese Unterschiede beruhen ebenfalls auf der Art wie Leptin in das Gehirn penetriert. Der Pe, PaV und die PH, die direkt am  $V_{III}$  lokalisiert sind, können offenbar wesentlich besser durch i.c.v.-appliziertes Leptin erreicht werden als durch zirkulierendes Leptin. Dieses muss beispielsweise von der ME aus, die von diesen Gebieten weiter entfernt liegt und eine offene Blut-Hirn-Schranke besitzt, zum Pe, PaV und zur PH diffundieren. Die LH reagiert anscheinend nur auf zentral appliziertes Leptin, wohingegen im PMV eine nukleäre STAT3-Translokation ausschließlich durch systemisches Leptin induziert werden kann. Der PMV liegt möglicherweise schon außerhalb des Bereichs, der von Leptin durch Diffusion aus dem  $V_{III}$  erreichbar zu sein scheint. Somit kann dieses Kerngebiet eher durch zirkulierendes Leptin aktiviert werden, da die Distanz zur ME geringer ist als zum  $V_{III}$ .

| hypothalamische Kerngebiete | nukleäre STAT3-Expression<br>90min nach systemischer<br>Leptin-Applikation | nukleäre STAT3-Expression<br>30min nach zentraler<br>Leptin-Applikation |
|-----------------------------|--|---|
| ARC                         | +++  | +++   |
| VMH                         | +++  | +++   |
| DMH                         | ++   | +++   |
| PAA                         | ++   | ++  |
| PMV                         | ++   | –   |
| RCH                         | ++   | ++  |
| PaV                         | –  | +   |
| LH                          | –  | ++  |
| PH                          | –  | ++  |
| Pe                          | –  | ++  |

**Tab. 24**

**Gegenüberstellung der durch periphere (3.1.1.) und zentrale Leptin-Applikation (Hübschle et al. 2001) induzierte nukleäre STAT3-Expression in hypothalamischen Kerngebieten der Ratte zum jeweils optimalen Perfusions-Zeitpunkt.**

Banks und Kollegen (1999) begründen die Leptin-induzierte Zell-Aktivierung in von den CVOs entfernten Kerngebieten mit einem selektiven aber sättigbaren Transportsystem (1.5.1.) für Leptin (Banks et al. 1999). Im Gegensatz dazu sehen Rivest und Kollegen (2002) die Antwort für diese Phänomene in weniger dichten Arteriolen und Venolen, die Leptin in stark vaskularisierten Kerngebieten selektiv ins Gewebe übertreten lassen (Rivest 2002). Entsprechend dieser Theorie sollte dieses auch auf die LH zutreffen, was aber unseren Ergebnissen nach mit systemischer Leptin-Applikation nicht der Fall war. Möglicherweise spielen für die Aktivierung der Zellen in hypothalamischen Kerngebieten noch andere bis heute unbekannte Faktoren eine entscheidende Rolle. So könnten z.B. durch Leptin aktivierte

sekundäre Mediatoren ebenfalls über membranständige Rezeptoren die JAK-STAT-Kaskade aktivieren und eine STAT3-Translokation auslösen (Rivest 2002).

Interessanterweise zeigten Münzberg und Kollegen (2003) nach systemischer Leptin-Applikation im *Hypothalamus* der Ratte eine nukleäre STAT3-Translokation im ARC, VMH, DMH, PaV und in der LH schon 45min nach der Stimulation (Münzberg et al. 2003). Aus den hier vorgelegten Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass eine nukleäre STAT3-Translokation im ARC, VMH, DMH und im PMV erst nach 90min ihr Maximum erreichte. Da diese Arbeitsgruppe keinen Zeitverlauf dokumentiert hat, kann man davon ausgehen, dass sie offenbar das Maximum der STAT3-Signale nicht abgewartet haben. Dass die nukleären Signale auf die genannten hypothalamischen Kerngebiete beschränkt war, hängt womöglich von der immunhistochemischen Detektion der phosphorylierten Form der STAT3-Faktoren ab. In der RCH und im PMV wurden, im Gegensatz zu meinen Ergebnissen, mit der Detektion beider, der phosphorylierten und der unphosphorylierten Form von STAT3, erstaunlicherweise keine Signale gefunden. In meiner Studie konnten in der RCH schon nach 30min Stimulationszeit ebenso viele nukleäre STAT3-Signale detektiert werden wie nach 90min. Wäre diese Tatsache allein durch die Detektion der unphosphorylierten STAT3-Faktoren, die auch zu einem geringen Anteil im Kern vorkommen können (1.6.2.1.), begründet, wäre die Intensität der hier gezeigten Signale wesentlich reduziert, was allerdings nicht bestätigt werden konnte. Für die Detektion von nukleären Signalen im PMV haben Münzberg und Kollegen (2003) möglicherweise einen zu frühen Zeitpunkt nach der Stimulation gewählt. Die Tatsache, dass diese Arbeitsgruppe in der LH und im PaV, in denen hier ausschließlich zytoplasmatische STAT3-Signale nachgewiesen wurden, eine nukleäre STAT3-Translokation detektiert hat, könnte darauf beruhen, dass kein eindeutiger Beweis für eine nukleäre Lokalisation geführt wurde.

#### **4.2.2.1. Neurone**

Nachdem die Lokalisation von Leptin-aktivierten Zellen im ZNS der Ratte durch die Detektion der nukleären STAT3-Translokation nachgewiesen wurde, sollte der Phänotyp dieser Zellen bestimmt werden. Bisher sind z.B. nach systemischer Leptin-Applikation keine Studien durchgeführt worden, in denen ein klarer Beweis über den neuronalen Ursprung STAT3-positiver Zellen erbracht wurde. Einen Hinweis auf eine neuronale Aktivität geben lediglich wenige Kolokalisationsstudien, bei denen definierte neuronale Gen-Produkte (TRH und POMC) in STAT3-positiven Zellen immunhistochemisch detektiert wurden (Münzberg et al. 2003, Huo et al. 2004). Hierdurch werden aber nur wenige definierte Neurone erkannt, die

keinen Überblick über alle Leptin-responsiven, mit nukleärer STAT3-Translokation reagierenden Neurone in hypothalamischen Kerngebieten geben können.

In dieser Arbeit und anderen Studien aus unserer Arbeitsgruppe wurde der neuronale Ursprung STAT3-positiver Zellen mittels eines Markers für Neuronen-spezifische Kern-Proteine (NeuN) nachgewiesen (Harré 2003, Harré et al. 2003, Rummel et al. 2005). In vielen hypothalamischen Kerngebieten, die in der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase (ARC, VMH, DMH und RCH, 1.10.) sowie in der zentralnervösen Steuerung der Reproduktion (PMV, 1.10.7.) involviert sind und nach systemischer Leptin-Applikation mit der Translokation von STAT3-Faktoren reagierten, konnten Koloalisationen von sämtlichen STAT3-positiven Zellkernen mit NeuN-markierten Zellkernen nachgewiesen werden. Bis auf wenige Ausnahmen konnte erstmals ein klarer Beweis erbracht werden, dass zirkulierendes Leptin eine STAT3-Translokation in Neuronen definierter hypothalamischer Kerngebiete induzieren kann. Welche Gene in diesen Neuronen durch die STAT3-Faktoren aktiviert werden, muss allerdings noch eingehend untersucht werden. Im ARC kommen vornehmlich NPY/AgRP- und POMC/CART-Neurone vor, die ebenfalls die lange Form der Leptin-Rezeptoren exprimieren (Cheung et al. 1997, Baskin et al. 1999a, Baskin et al. 1999c). Es gibt lediglich Hinweise darauf, dass im medialen ARC NPY/AgRP-Neurone in ihrer neuronalen Aktivität durch Leptin gehemmt werden (Traebert et al. 2002), jedoch ist nicht klar, wie diese Inhibition vermittelt wird. Einige Autoren stellen die Hypothese einer cAMP-abhängigen Hemmung über den PI-3-Kinase-Weg auf (Akabayashi et al. 1994, Shimizu-Albergine et al. 2001), wobei andere eine SOCS-3-vermittelte Hemmung favorisieren (Hakansson and Meister 1998, Elias et al. 1999, Banks et al. 2000). Meine Ergebnisse unterstützen die zweite These, da besonders im medialen Anteil des ARC zahlreiche STAT3-positive Neurone vertreten waren (3.1.2.1.). In POMC/CART-Neuronen, die im lateralen ARC lokalisiert sind, wurde die Fähigkeit zur STAT3-Expression auf Gen-Ebene (Bousquet et al. 2000) sowie nach systemischer Leptin-Applikation bereits nachgewiesen (Münzberg et al. 2003). Über die Funktion einer Leptin-induzierten nukleären STAT3-Translokation in Neuronen des VMH sind bis heute noch keine Studien durchgeführt worden. Meine Ergebnisse zeigen eindeutig, dass im VMH Neurone durch zirkulierendes Leptin über die Expression von STAT3-Faktoren aktiviert werden (3.1.2.1.). Ein Gen-Produkt, das besonders im VMH synthetisiert wird, ist BDNF (Kernie et al. 2000). Ob BDNF-Neurone Leptin-induziert STAT3 translozieren, muss in weiteren Studien untersucht werden. Auch im DMH, PMV und in der RCH zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse eine eindeutige Koloalisation von STAT3-positiven Kernen mit der NeuN-Immunreaktivität (3.1.2.1.). Neurone dieser

Kerngebiete synthetisieren insbesondere CART (Ter Horst and Luiten 1986, Couceyro et al. 1997, Koylu et al. 1997, Elias et al. 1998a, Koylu et al. 1998, Rondini et al. 2004). Vom lateralen Anteil des ARC weis man, dass CART-Neurone (POMC/CART-Neurone) Ob-Rb synthetisieren und über die STAT3-Faktoren eine Transkription von POMC bzw. CART stimuliert wird. Somit liegt es nahe, dass möglicherweise auch im DMH, PMV und in der RCH, wo ebenfalls CART-Neurone vorkommen, CART über die Leptin-induzierte Aktivierung von STAT3 synthetisiert wird. Neben CART kommen im DMH auch PrRP-synthetisierende Neurone vor (Ibata et al. 1984, Ibata et al. 1986, Maruyama et al. 1999), wobei in PrRP-Neuronen die Existenz von Leptin-Rezeptoren (Ellacott et al. 2002) und ein stimulierender Effekt von Leptin auf die PrRP-Synthese bereits nachgewiesen wurde (Lawrence et al. 2000, Lawrence et al. 2002b). Meine Ergebnisse lassen vermuten, dass nach systemischer Leptin-Applikation in Neuronen der RCH und des PMV die Synthese von CART und in Neuronen des DMH die Synthese von CART und/oder PrRP möglicherweise STAT3-vermittelt ist.

#### **4.2.2.2. Endothelzellen**

Da im Gehirn der Ratte nach systemischer Leptin-Applikation nukleäre STAT3-Signale auch außerhalb der hypothalamischen Kerngebiete, allem Anschein nach in Blutgefäßen, vorzufinden waren, mussten weitere Kolokalisationsstudien mit einem Endothel-spezifischen Marker durchgeführt werden. In dieser Arbeit (3.1.2.2.) und in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe konnten STAT3-positive Zellen endothelialen Ursprungs mittels Detektion des von-Willebrand-Faktors identifiziert werden (Rummel et al. 2005). Bisher konnte mit keiner Studie belegt werden, dass zirkulierendes Leptin STAT3 in Endothelzellen des ZNS aktivieren kann. Die Expression von Leptin-Rezeptoren in Blutgefäßen des Gehirns wurde allerdings schon nachgewiesen (Bjorbaek et al. 1998b). Über die Funktion dieser Rezeptoren wird bisher nur spekuliert. Die kurzen Isoformen, die hauptsächlich im PC aber auch in Endothelzellen anderer im Gehirn vorkommenden Blutgefäße lokalisiert sind, scheinen ein Transportsystem von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke darzustellen (Tartaglia et al. 1995, Banks et al. 1996, Golden et al. 1997, Bjorbaek et al. 1998b). Die lange Form der Leptin-Rezeptoren (Ob-Rb) ist in kultivierten Endothelzellen (Sierra-Honigmann et al. 1998) sowie hauptsächlich im Kleinhirn und, wenn auch nur in geringer Ausbreitung, in kleinen Blutgefäßen des *Hypothalamus* (Bjorbaek et al. 1998b) lokalisiert. Weitere Studien haben gezeigt, dass Leptin in der Lage ist, die Neovaskularisation in der Plazenta, in fetalen Geweben (Trayhurn et al. 1999), in der *Cornea* von Ratten (Sierra-Honigmann et al. 1998), in

der Retina von Mäusen (Suganami et al. 2004) sowie die Expression von Metalloproteinasen *in vitro* und *in vivo* (Park et al. 2001) zu stimulieren. Dieser angiogenetische Effekt wird unter anderem über die Aktivierung des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) vermittelt, dessen Synthese STAT3-induziert zu sein scheint (Suganami et al. 2004). Auch Jin und Kollegen (2003) konnten vor allem eine erhöhte STAT3- aber auch MAPK-Aktivität in Endothelzellen magerer „Zucker-Ratten“ nachweisen (Jin et al. 2003). Der angiogenetische Effekt von Leptin wird oft mit erhöhten arteriosklerotischen Veränderungen während der Fettleibigkeit in Zusammenhang gebracht. Die bei einer Fettleibigkeit entstehende Resistenz gegenüber Leptin (1.8.) bedingt eine verminderte Neovaskularisation und erhöht somit die Gefahr einer Arteriosklerose (Park et al. 2001, Jin et al. 2003). Durch meine Ergebnisse konnte erstmals die lange Form der Leptin-Rezeptoren Ob-Rb funktionell in Endothelzellen des Gehirns der Ratte nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass Ob-Rb nur gering in kleinen Blutgefäßen exprimiert wird, wird durch meine Ergebnisse dahingehend bestätigt, dass nur in vereinzelten Blutgefäßen im Gehirn der Ratte eine Leptin-induzierte STAT3-Translokation detektierbar war. Möglicherweise stimuliert Leptin ebenso wie in peripheren Geweben (siehe oben) auch im ZNS über eine Aktivierung der JAK-STAT-Kaskade die Angiogenese der kleinen Blutgefäße. Vielleicht kann die verminderte Leptin-induzierte Neovaskularisation als ein zusätzlicher möglicher Pathomechanismus für die erhöhte Schlaganfall-Gefahr bei Fettleibigkeit (Strazzullo et al. 2004) angesehen werden.

#### **4.2.2.3. Andere Zellphänotypen**

Neben hypothalamischen Kerngebieten und Endothelzellen im gesamten Gehirn konnte durch meine Ergebnisse auch eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Immunreaktivität im PC der  $V_1$  festgestellt werden. Durch Kolokalisationsstudien mit einem vW-spezifischen Marker konnte für diese Zellen eindeutig ein nicht endothelialer Ursprung nachgewiesen werden. Ebenso konnte in der STAT5-Teilstudie gezeigt werden, dass Zellen im PC der  $V_1$  keine Neurone und Astrozyten sind. Daher liegt ein weiterer Leptin-responsiver Zelltyp im Gehirn der Ratte vor, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um die hochspezialisierten ependymalen Epithelzellen (PC) handelt. Die primäre Funktion dieser spezialisierten Zellen ist die Produktion des *Liquor* (Redzic and Segal 2004). Erstaunlicherweise konnten bisher ausschließlich die kurzen Formen des Leptin-Rezeptors (nicht funktionell bezüglich der JAK-STAT-Kaskade) im PC nachgewiesen werden (Elmqvist et al. 1998a, Baskin et al. 1999c). Im Gegensatz dazu zeigten meine Ergebnisse eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation in diesen Zellen, was auf die lange Rezeptorform hinweist. Möglicherweise ist



die Detektion von Ob-Rb-Rezeptoren, wie sie in den oben genannten Studien durchgeführt wurden, nicht sensitiv genug, um eine eventuell nur gering vorkommende Rezeptorexpression nachzuweisen, während die hier eingesetzte STAT3-Methode hierzu sensitiv genug war. Andererseits ist es auch möglich, dass aufgrund der relativ geringen Tierzahl (zum Zeitpunkt 90min waren dies vier Leptin- und vier NaCl-stimulierte Tiere) in meiner Studie keine klare Aussage über die Spezifität explizit dieser Signale getroffen werden kann. Zweifelsohne müssen weitere Untersuchungen folgen, um eine eindeutige Aussage über die funktionelle Responsivität dieses Zelltyps gegenüber Leptin machen zu können.

#### **4.2.3. STAT5**

Der Transkriptionsfaktor STAT5 kann ebenso wie STAT3 durch die Ob-Rb-assoziierte JAK phosphoryliert werden (Grimley et al. 1999). Eine Leptin-induzierte Translokation von STAT5-Faktoren ist somit von der Verteilung der funktionellen Leptin-Rezeptoren abhängig. Da in der Literatur bislang nur in peripheren Geweben eine Leptin-induzierte (Morton et al. 1998, Briscoe et al. 2001, Goiot et al. 2001, Carnevali et al. 2003) sowie im ZNS eine durch andere Zytokine induzierte STAT5-Translokation beschrieben war (Grattan et al. 2001, Lerant et al. 2001, Rizk et al. 2001, Liu et al. 2002, Natarajan et al. 2004), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Leptin nicht auch im ZNS der Ratte in der Lage ist, außer STAT3 auch STAT5 zu aktivieren. Entgegen aller Behauptungen, Leptin könne im *Hypothalamus* seine Wirkung über die JAK-STAT-Kaskade allein mittels Aktivierung von STAT3 vermitteln (Vaisse et al. 1996, Meister 2000), wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass auch eine Leptin-induzierte Aktivierung von STAT5 möglich ist.

Durch eine zentrale Applikation von Leptin in den  $V_1$  der Ratte und einer anschließenden immunhistochemischen Analyse mittels DAB-Färbung war eine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation in vielen Regionen des Gehirns nachweisbar (3.2.1.). Bei genauerer Betrachtung und einem Vergleich mit den entsprechenden Kontrolltieren konnten im PaV, Pe, PMV und SO nur geringfügige Unterschiede in der Dichte der nukleären STAT5-Signale beobachtet werden. Diese lag etwa 30min nach der Leptin-Stimulation jeweils um nur einen Bewertungspunkt höher als bei den Kontrolltieren. Zu späteren Perfusionszeitpunkten verschwanden die nukleären STAT5-Signale bis auf wenige im ARC gänzlich. Das Maximum der Dichte induzierter STAT5-Signale lag mit 30min nach zentraler Stimulation beim gleichen Zeitpunkt wie bei der durch zentrale Leptingabe induzierten STAT3-Translokation (Hübschle et al. 2001). Aufgrund der limitierten Aussagekraft der durch die i.c.v.-Applikation gewonnenen Ergebnisse, wurde dieser experimentelle Ansatz nicht weiter verfolgt.

Möglicherweise rief allein der mechanische Stimulus der Applikation schon eine STAT5-Translokation vor allem in periventrikulär gelegenen Kerngebieten hervor (4.1.1.).

Nach der peripheren (physiologisch relevanten) Applikation von Leptin in die Bauchhöhle waren die Leptin-induzierten STAT5-Signale im Gegensatz zu den vergleichbaren Kontrolltieren deutlich stärker ausgeprägt. Die Dichte der Signale war in den meisten hypothalamischen Kerngebieten 120min nach der Stimulation am höchsten. Ähnlich wie es schon für STAT3 gezeigt wurde (4.2.2.), wird auch STAT5 durch eine systemische Applikation von Leptin wesentlich später induziert als nach zentraler Gabe (30min). Der Grund hierfür liegt möglicherweise ebenfalls in der erforderlichen Zeit zur Resorption von Leptin aus der Bauchhöhle und dem Übergang ins Gehirn (4.2.2.). In der RCH war die maximale Dichte an nukleären STAT5-Signalen sogar erst 150min nach der Stimulation zu beobachten (Abb. 41). Möglicherweise hängt dies mit der weiteren Entfernung der RCH zur ME zusammen, die als eine mögliche Eintrittspforte für Leptin ins Gehirn diskutiert wird (Rivest 2002). Es ist allerdings offensichtlich, dass die Induktion von nukleären STAT3-Signalen nach systemischer Applikation von Leptin im *Hypothalamus* der Ratte bei den Versuchstieren konstanter auftrat als eine Induktion von nukleären STAT5-Signalen. Hier waren zwischen den einzelnen Tieren z.T. deutliche Unterschiede in Bezug auf die Dichte, jedoch nicht auf das Verteilungsmuster nukleärer STAT5-Signale zu verzeichnen. Die Verteilung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Signale unterscheidet sich deutlich vom Verteilungsmuster der Leptin-induzierten nukleären STAT3-Signale nach systemischer Applikation (Tab. 25). Im VMH und DMH, wo STAT3 moderat bis stark in Zellkernen detektiert werden konnte, kamen keine Leptin-induzierten nukleären STAT5-Signale vor. Im Gegensatz dazu waren im SO und TM geringe bis moderate nukleäre STAT5- aber keine STAT3-Signale vertreten. Im ARC war die Tatsache auffallend, dass nicht nur im medialen und lateralen Anteil, wie es für STAT3 der Fall war, sondern auch im dorsalen Anteil Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Signale zu finden waren (Abb. 37a und Abb. 44). Jedoch war die Dichte Leptin-induzierter nukleärer STAT3-Signale im ARC 90min nach der Stimulation über 2,5mal höher als die nukleäre STAT5-Translokation 120min nach der Stimulation (Abb. 52).

Mit diesen Erkenntnissen und trotz der Einschränkung, dass die Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation bei den einzelnen Tieren heterogen ausgefallen war, zeigen die Ergebnisse im *Hypothalamus* der Ratte offensichtlich eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Translokation, die kernspezifisch unterschiedlich ausgeprägt zu sein scheint (vergleiche z.B. ARC-Subkerne).

| hypothalamische<br>Kerngebiete | nukleäre STAT5-Expression<br><i>120 bzw. 150min post<br/>injectionem</i> | nukleäre STAT3-Expression<br><i>90min<br/>post injectionem</i> |
|--------------------------------|--|--|
| ARC                            | ++   | +++  |
| PMV                            | ++   | ++   |
| SO                             | ++   | –  |
| RCH                            | ++ (150min)  | ++   |
| TM                             | +  | –  |
| PAA                            | +  | ++   |
| Pe                             | +  | –  |
| DMH                            | –  | ++   |
| VMH                            | –  | +++  |

**Tab. 25**

**Gegenüberstellung der durch periphere Leptin-Applikation induzierte nukleäre STAT5- (3.2.2.1.) bzw. STAT3-Expression (3.1.1.) in hypothalamischen Kerngebieten der Ratte zum jeweils optimalen Perfusionszeitpunkt.**

#### 4.2.3.1. Neurone

Ebenso wie bei dem neuronalen Nachweis der nukleären STAT3-Translokation sollte der neuronale Ursprung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Signale mittels der Markierung von NeuN bestätigt werden. Die immunhistochemischen Analysen konnten zeigen, dass auch nukleäre STAT5-Signale mit der NeuN-Immunreaktivität kolokalisiert waren (3.2.2.3.1.). Durch eine quantitative Auswertung konnte in den Kerngebieten ARC, PMV, RCH, TM und besonders im SO eine weitestgehende Übereinstimmung der nukleären STAT5- und der NeuN-Signale nachgewiesen werden (Abb. 47). Bisher kann über die Funktion dieser STAT5-positiven Neurone nur spekuliert werden. Studien mit STAT5a- und/oder STAT5b-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass diese Tiere ein gestörtes Wachstum, eine gestörte Entwicklung sowie weibliche Tiere eine fehlende Laktation und Infertilität, die auf einer Insuffizienz der *Corpora lutea* der Ovarien beruhen, aufweisen (Liu et al. 1997, Udy et al. 1997, Teglund et al. 1998). Möglicherweise greifen die Leptin-aktivierten STAT5-positiven Neurone modulierend in das Reproduktionssystem, die Prolaktin- und GH-Sekretion ein. Für CART-erge Neurone, besonders des PMV, ist eine Projektion zu GnRH-synthetisierenden Neuronen, die die Sekretion des luteinisierenden und Follikel-stimulierenden Hormons aus dem HVL stimulieren (1.9.3.1.), im MnPO, MPO und OVLT bereits bewiesen (Canteras et al. 1992, Rondini et al. 2004). Im ARC kommen neben NPY/AgRP- und POMC/CART-synthetisierenden Neuronen auch GHRH-erge Neurone vor (Niimi et al. 1989, Hajdu et al. 2003), welche möglicherweise eine Verbindung zwischen Leptin und dem Wachstum darstellen. Zusätzlich kommen vor allem im dorsomedialen Anteil des ARC dopaminerge Neurone (sogenannte tuberohypophysäre dopaminerge Neurone = THDA) vor, die lange

Projektionen in die Neuro- und Zwischen-Hypophyse aussenden (Lookingland et al. 1985, Kawano and Daikoku 1987). Wie in 1.9.3.5. beschrieben, hemmt Dopamin die Prolaktin-Synthese und -Sekretion aus dem HVL (Memo et al. 1985, Lamberts and Macleod 1990, Elsholtz et al. 1991, Freeman et al. 2000), wohingegen Prolaktin wiederum über einen negativen Feedbackmechanismus die Sekretion von Dopamin in diesen Neuronen über eine Aktivierung von STAT5 stimuliert (Lerant et al. 2001). Möglicherweise reagieren diese im ARC-D lokalisierten Neurone ebenso Prolaktin- als auch Leptin-induziert mit einer nukleären STAT5-Translokation.

Entgegen der Behauptung, Neurone des SO würden Ob-R nicht exprimieren (Elmqvist et al. 1998a), konnten andere Studien zeigen, dass in magnozellulären Neuronen des SO, die Vasopressin und Oxytocin synthetisieren, Ob-R vorkommen (Hakansson et al. 1998). Eine immunhistochemische Studie konnte sogar die lange Form der Leptin-Rezeptoren im SO nachweisen (Baskin et al. 1999c). Funktionelle Studien zeigen einen kontroversen Einfluss von Leptin auf die Aktivierung von Neuronen im SO. So scheint Leptin die Sekretion von Vasopressin im SO zu stimulieren (Yamamoto et al. 1999) und andererseits aber die elektrische Aktivität von SO-Neuronen hauptsächlich zu inhibieren (Honda et al. 2002). Yamamoto und Kollegen (1999) konnten allerdings nicht zeigen, ob zentral appliziertes Leptin die Sekretion von Vasopressin direkt über die Aktivierung von Neuronen im SO oder aber nur indirekt über andere hypothalamische Kerngebiete stimuliert, welche in der Lage sind über Projektionen die elektrische Aktivität von Vasopressin- und Oxytocin-synthetisierenden Neuronen zu erhöhen (Ludwig and Leng 2000). Trotz dieser z.T. kontroversen Befunde scheint Leptin auf Vasopressin- und Oxytocin-synthetisierende Neurone im SO einen regulatorischen Effekt auszuüben. Die hier gezeigten Ergebnisse sprechen für einen STAT5-vermittelten Effekt von systemisch appliziertem Leptin auf magnozelluläre Neurone im SO (Abb. 46).

Auch in Neuronen des TM konnte immunhistochemisch eine schwache Expression von Ob-R nachgewiesen werden, wobei aber nicht zwischen den einzelnen Subtypen der Leptin-Rezeptoren unterschieden wurde (Hakansson et al. 1998). Neurone des TM synthetisieren Histamin und sind in die Regulation der Nahrungsaufnahme involviert (Morimoto et al. 1999, Morimoto et al. 2001). Histamin hemmt zentral-appliziert die Nahrungsaufnahme (Lecklin et al. 1998) und seine Synthese steigt bei Nahrungsaufnahme nach Hungerzuständen im *Hypothalamus* an (Itoh et al. 1991). Weiter verhindert eine Blockade der Histamin-Synthese einen Leptin-induzierten anorektischen Effekt (Morimoto et al. 1999). Aufgrund der Tatsache, dass Neurone des TM Leptin-Rezeptoren nur schwach exprimieren, scheint der Haupteffekt

auf das Histaminsystem nur indirekt Leptin-vermittelt zu sein. Dieser indirekte Effekt wird mittels des Leptin-induzierten  $\alpha$ -MSH aus POMC-Neuronen (1.9.1.5.), die im lateralen ARC lokalisiert sind (1.10.1.) und zu Histamin-ergen Neuronen im TM projizieren, vermittelt (Fekete and Liposits 2003). Dennoch zeigen meine Ergebnisse einen eindeutigen Beweis einer Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation in Neuronen des TM (Abb. 46), was vermuten lässt, dass Leptin über eine Aktivierung von STAT5 auch einen direkten Effekt auf das Histaminsystem haben könnte. Der indirekte Effekt über eine Aktivierung des  $\alpha$ -MSH scheint eher STAT3-vermittelt zu sein.

#### ***4.2.3.2. Andere Zellphänotypen***

Da im ARC ca. 79% der Leptin-induzierten STAT5-positiven Zellkerne mit der NeuN-Immunreaktivität kolokalisiert waren (3.2.2.3.1.), stellte sich die Frage nach dem zellulären Ursprung der restlichen 21%. Offensichtlich waren in hypothalamischen Kerngebieten nicht nur Neurone Leptin-responsiv. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde eine weitere Kolokalisationsstudie mit dem Astrozyten-spezifischen Marker GFAP durchgeführt (3.2.2.3.2.). Im ARC ließen sich dabei, im Gegensatz zur RCH und zum PMV, sowohl im medialen als auch im lateralen Anteil vereinzelte STAT5-positive Astrozyten detektieren (Abb. 48 und Abb. 49). Astrozyten unterstützen Neurone strukturell und funktionell und können eine Vielzahl an neuroaktiven Faktoren sezernieren. Solche Faktoren sind z.B. „transforming growth factor- $\alpha$ “ und „- $\beta$ “, „insulin-like growth factor-I“ (IGF-I) und Prostaglandin-E2. In 1.9.3.4. wurde dargestellt, dass Leptin mit dem Wachstumshormon und IGF-I interagiert. Dhandapani und Kollegen (2003) schreiben hypothalamischen Astrozyten einen Einfluss auf die GnRH-Sekretion zu (Dhandapani et al. 2003). Studien aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass auch Astrozyten sowohl in der Ratte als auch im Meerschweinchen STAT3-Transkriptionsfaktoren exprimieren können (Harré et al. 2003, Rummel et al. 2005). Auch liegen im ARC der Ratte spezialisierte Astrozyten mit „brain fatty acid binding proteins“ (bFABP) direkt benachbart zu Leptin-responsiven STAT3-immunreaktiven Neuronen (Young 2002). Jedoch wurde in der Studie von Young kein Beweis darüber geführt, dass die STAT3-positiven Neurone tatsächlich Leptin-responsiv sind. Allerdings lässt die räumliche Anordnung vermuten, dass bFABP-erge Astrozyten möglicherweise mit Leptin-responsiven Neuronen im ARC interagieren und somit die Funktion der Nahrungsaufnahme-regulierenden Neurone beeinflussen könnten (Young 2002).

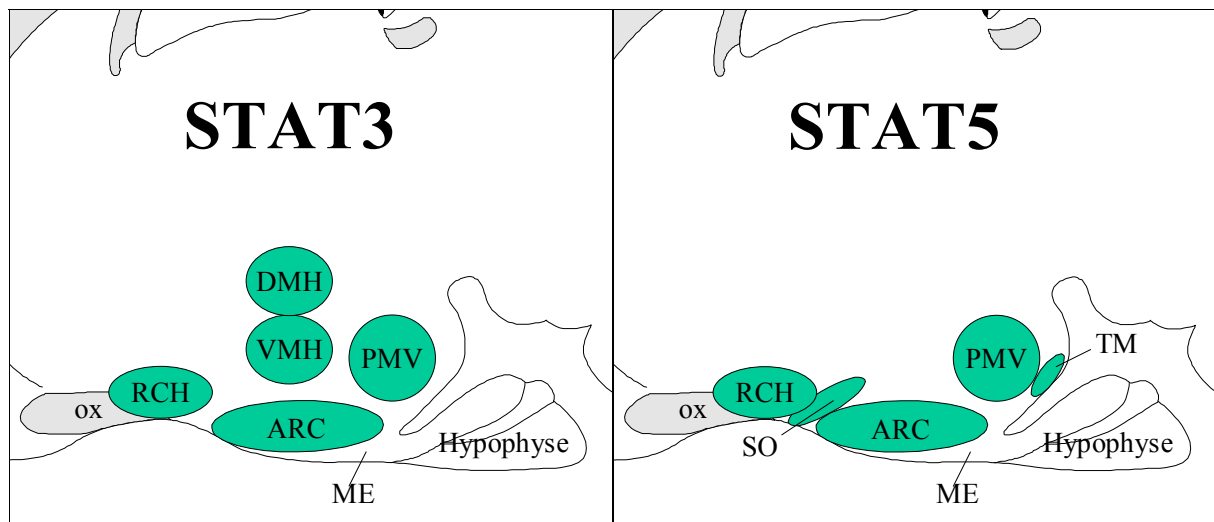
Offensichtlich kann Leptin direkt in Astrozyten des ARC eine nukleäre STAT5-Translokation bewirken, die möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und/oder der Reproduktion zu spielen scheint.

Neben Neuronen und Astrozyten in hypothalamischen Kerngebieten konnte ich in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch andere Zellphänotypen im ZNS der Ratte nach systemischer Leptin-Applikation mit einer nukleären STAT5-Translokation reagieren können. So waren im PC der  $V_1$  und im Ependym des  $V_{III}$  STAT5-positive Kerne detektierbar. Die Spezifität der Signale im PC allerdings ist nicht eindeutig Leptin-induziert, da auch Kontrolltiere z.T. moderate nukleäre STAT5-Signale in Zellen des PC aufwiesen. Dies kann mit der recht unterschiedlichen Reaktion der einzelnen Tiere zusammenhängen (4.2.3.). Für eine eher unspezifische STAT5-Translokation im PC spricht auch die Tatsache, dass bisher ausschließlich kurze Leptin-Rezeptoren im PC nachgewiesen werden konnten (Elmqvist et al. 1998a, Baskin et al. 1999c). Im Gegensatz dazu konnte Baskin und Kollegen (1999) wohl aber eine Ob-Rb-Expression in Ependymzellen des  $V_{III}$  nachweisen (Baskin et al. 1999c). Durch meine Untersuchungen konnte eine Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation in Zellen des Ependyms des  $V_{III}$  mit maximaler Expression 150min nach der Stimulation nachgewiesen werden (Tab. 19.). Der zelluläre Ursprung konnte allerdings nur für Neurone, Endothelzellen und Astrozyten ausgeschlossen werden, so dass keine direkte Phänotypisierung dieser STAT5-positiven Zellen durchgeführt wurde. Wahrscheinlich handelt es sich aber hierbei um ependymale Zellen, was schon allein durch die zweifelsfreie Lokalisation nahe liegt.

### 4.3. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven

Leptin ist in der Lage, im *Hypothalamus* der Ratte seine Wirkung auf hypothalamisch regulierte Funktionen des Organismus, insbesondere die Regulation der Nahrungsaufnahme, Energie-Homöostase und Steuerung der hypophysären Hormonsekretion, sowohl STAT3- als auch STAT5-vermittelt, zu entfalten. Dabei tritt eine Leptin-induzierte nukleäre STAT3- bzw. STAT5-Translokation im *Hypothalamus* kernspezifisch auf. Das heißt es gibt Kerngebiete, die auf Leptin spezifisch mit einer nukleären STAT3- bzw. STAT5-Translokation reagieren (Abb. 55). Neben dieser Kernspezifität existiert aber auch eine Zellspezifität. So reagieren sowohl Neurone in hypothalamischen Kerngebieten, Endothelzellen in Blutgefäßen des gesamten Gehirns und Zellen des PC in den  $V_1$  Leptin-induziert mit einer nukleären Translokation von STAT3. Dies konnte nach i.c.v.-Applikation von Leptin nicht bestätigt

werden (Hübschle et al. 2001). Zusätzlich antworten ebenfalls Neurone der Leptin-responsiven Kerngebiete aber auch Astrozyten im ARC und ependymale Zellen im V<sub>III</sub> nach systemischer Leptin-Applikation mit einer STAT5-Aktivierung. Leptin ist somit in der Lage auf unterschiedliche Weise in die oben genannten Mechanismen über neuronale und astrozytäre Transmitter einzugreifen. Darüber hinaus vermag Leptin direkt in die Funktion des Blutgefäßsystems auf der Ebene der Endothelzellen einzugreifen und eine bis heute unbekannte Rolle in der Produktion des Liquors durch einen direkten Effekt auf die PC-Zellen zu spielen.



**Abb. 55**

Schematische Übersicht über den *Hypothalamus* der Ratte. Die blau eingefärbten Bereiche markieren jeweils hypothalamische Kerngebiete als Leptin-Zielstrukturen. Auf der linken Hälfte sind solche Kerngebiete markiert, in denen Leptin eine Translokation von STAT3 und auf der rechten Hälfte solche, in denen Leptin eine Translokation von STAT5 bedingt.



Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Perspektiven für weitere experimentelle Ansätze, die in zukünftigen Studien bearbeitet werden können:

- Welche Zielgene werden bei der Leptin-induzierten nukleären STAT3- bzw. STAT5-Aktivierung in ihrer Expression moduliert?
- Gibt es Zelltyp-spezifische Unterschiede in der genomischen Aktivierung durch STAT3 bzw. STAT5?
- Welche physiologische Relevanz hat die in dieser Arbeit erstmals festgestellte genomische Aktivierung von Hirn-Endothelzellen?
- Was bewirkt die Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Translokation in hypothalamischen Kerngebieten, die keine STAT3-Aktivierung zeigten?
- Welche Möglichkeit der Interaktion beider Transkriptionsfaktoren gibt es?
- Hat die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Zeitabhängigkeit der nukleären STAT3- bzw. STAT5-Aktivierung eine physiologische Relevanz?

## 5. KAPITEL

### Zusammenfassung

Leptin greift in die Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase sowie bei der Modulation vieler anderer neuroendokriner Mechanismen hauptsächlich über den *Hypothalamus* ein. Hier werden Leptin-induzierte Effekte über den JAK-STAT-Signalweg, besonders über eine Aktivierung des STAT3-Transkriptionsfaktors, vermittelt. In vielen peripheren Geweben ist Leptin ebenfalls in der Lage, eine nukleäre STAT5-Translokation auszulösen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Strukturen im Gehirn der Ratte, besonders in hypothalamischen Kerngebieten, eine Leptin-Wirkung über den JAK-STAT-Signalweg vermitteln. Ausschlaggebend für eine Kartierung funktioneller Leptin-Zielstrukturen ist die Detektion einer nukleären STAT-Translokation in Zellen des Gehirns. Zu diesem Zweck wurden Studien an zwei *in vivo*-Modellen an Ratten durchgeführt. Zum einen wurde Leptin zentral (i.c.v., 3,5µg/Tier) zur Detektion von Leptin-induzierten nukleären STAT5-Faktoren und zum anderen systemisch (i.p., 5mg/kg KM) zur Detektion von Leptin-induzierten nukleären STAT3- bzw. STAT5-Faktoren appliziert. Die Detektion dieser nukleären STAT3- bzw. STAT5-Signale erfolgte mittels immunhistochemischen Analyse-Verfahren. Die Phänotypen Leptin-responsiver Zellen im Gehirn der Ratte wurden zusätzlich bestimmt. Durch Kolokalisationsstudien mittels einer Detektion der STAT3- bzw. STAT5-Faktoren und der DAPI-Kernfärbung konnte ein eindeutiger nukleärer Ursprung der Signale nachgewiesen werden. Unter dem Einsatz von zellspezifischen Marker-Proteinen (NeuN für Neurone, vW-Faktor für Endothelzellen und GFAP für Astrozyten) konnten dann die nukleären STAT3- bzw. STAT5-Signale bestimmten Zellphänotypen zugeordnet werden.

Nach systemischer Leptingabe traten nukleäre STAT3-Signale am intensivsten und häufigsten zum Zeitpunkt 90min *post injectionem* auf. Sie waren im caudobasalen *Hypothalamus* vor allem im *Nucleus arcuatus* (ARC, medialer und lateraler Subkern), *Nucleus hypothalamicus ventromedialis* (VMH, dorsomedialer Subkern), *Nucleus hypothalamicus dorsomedialis* (DMH, ventraler Subkern), *Nucleus praemamillaris ventralis* (PMV), in der *Area retrochiasmatica* (RCH) und der *Area periarquata* (PAA) vertreten. Außerhalb des *Hypothalamus* konnten Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Signale sowohl in dem im Hirnstamm lokalisierten *Nucleus tractus solitarius* (Sol) als auch in Blutgefäßen im gesamten Gehirn und im *Plexus choroideus* (PC) beider  $V_1$  detektiert werden. Mittels der Kolokalisationsstudien konnte zum ersten Mal die Leptin-induzierte nukleäre STAT3-Translokation klar in Neuronen, Endothelzellen und Zellen des PC nachgewiesen werden.

Somit spielen außer Neurone auch andere nicht-neuronale Zellphänotypen eine funktionelle Rolle bei der Signalübermittlung des Fettgewebhormons Leptin.

Ebenfalls erstmals konnte gezeigt werden, dass Leptin neben einer Aktivierung von STAT3 im *Hypothalamus* auch eine nukleäre STAT5-Translokation induzieren kann. Das Antwortverhalten auf die Leptingabe hin fiel jedoch von Einzeltier zu Einzeltier sehr heterogen aus. So fiel auf, dass nach zentraler Gabe, außer im *Nucleus supraopticus* (SO), kaum ein Unterschied zwischen Leptin-stimulierten und NaCl-behandelten Tieren nachzuweisen war. 30min nach der Stimulation traten geringfügig mehr Leptin-induzierte nukleäre STAT5-Signale im hypothalamischen *Nucleus paraventricularis* (PaV), *Nucleus periventricularis* (Pe), PMV und im *Nucleus praeopticus magnocellularis* (MCPO) als bei den Kontrolltieren auf. Im Gegensatz dazu waren nach der systemischen Stimulation mit Leptin 120min *post injectionem* (in der RCH und in Ependymzellen des V<sub>III</sub> nach 150min) die Dichte und Intensität der induzierten nukleären STAT5-Signale deutlich stärker als bei den Kontrolltieren. Hier reagierten besonders der ARC (nicht nur der mediale und laterale, sondern auch in geringem Umfang der dorsale Subkern), PMV, SO, TM, und die RCH mit einer Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation. Kolokalisationsstudien mit NeuN und anschließender quantitativer Bestimmung zeigten, dass der neuronale Anteil STAT5-positiver Zellen in diesen hypothalamischen Kerngebieten mit über 90% (außer im ARC mit ca. 80%) sehr hoch war. Neben diesen STAT5-positiven Neuronen konnten zumindest im ARC auch vereinzelte STAT5-positive Astrozyten identifiziert werden. Ein dritter Phänotyp Leptin-responsiver Zellen, die mit einer STAT5-Translokation reagierten, waren Zellen des Ependyms des V<sub>III</sub>. Für diesen Zelltyp konnte ein neuronaler und astrozytärer Ursprung ausgeschlossen werden.

Um eine Beteiligung anderer Zytokine bei der Induktion der JAK-STAT-Kaskade auszuschließen, wurden Plasma-IL-6- und -TNF-Werte gemessen. Weder für IL-6 noch für TNF konnte eine über den basalen Wert erhöhte Konzentration gemessen werden. Hingegen waren bei allen Tieren die Plasma-Leptin-Konzentrationen um mindestens das 45fache höher gegenüber den Werten der vergleichbaren Kontrolltiere.

Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass Leptin im *Hypothalamus* der Ratte seine Effekte über eine Aktivierung von STAT3 und STAT5 vermitteln kann. Für jeden dieser beiden Transkriptionsfaktoren gibt es ein spezifisches Verteilungsmuster funktionell aktivierter Zellen. Die Wirkung von Leptin im Gehirn der Ratte ist nicht nur auf Neurone beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf Astrozyten, Endothelzellen, Zellen des PC der V<sub>I</sub> und des Ependyms des V<sub>III</sub>.

## Summary

Leptin is involved in the regulation of food intake and energy homeostasis as well as in the modulation of various neuroendocrine mechanisms with all those functions predominantly controlled by the hypothalamus. Within the hypothalamus leptin induces its effects via the so-called JAK-STAT-signalling pathway and in particular by the activation of the signal transducer and activator of transcription factor 3 (STAT3). However, within many peripheral tissues leptin is also capable of activating another member of the STAT family, e.g. leading to nuclear STAT5 translocation.

This thesis neuroanatomically maps those hypothalamic structures within the rat brain that mediate leptin-induced functions via the JAK-STAT-signalling pathway. This is achieved by use of the immunohistochemical detection of leptin-induced nuclear STAT translocation (STAT3 and STAT5) in distinct target cells which in turn gives a map of those hypothalamic structures that can be functionally activated by leptin. Two experimental *in vivo* models were used for the study. One group of rats was treated with i.c.v. leptin application (3,5 µg of recombinant murine leptin per animal) as compared to the administration of pyrogen-free saline. A second group of rats received an intraperitoneal leptin injection (5 mg of recombinant murine leptin per kg body weight) as compared to the administration of pyrogen-free saline. The animals were then immunohistochemically investigated for nuclear STAT3 or STAT5 translocation. The nuclear translocation was assured with the nuclear DAPI staining. In addition, the phenotype of such leptin-responsive cells was analysed in immunohistochemical co-localization studies by use of distinct neuronal (NeuN), endothelial (vW factor) and astrocytic (GFAP) cell marker proteins.

Systemic leptin treatment induced nuclear STAT3-signals with the strongest response (number of responding cells as well as strength of the immunoreactivity) observed 90min after the treatment. In particular the caudobasal hypothalamus with its medial and lateral arcuate nucleus (ARC), dorsomedial aspects of the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), ventral aspects of the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH), the ventral premamillary nucleus (PMV), the retrochiasmatic area (RCH) and the periarculate area (PAA) proved to be STAT3-responsive. Besides this STAT3-activation in hypothalamic structures leptin induced nuclear STAT3-signals in the brainstem solitary tract nucleus (Sol), in the brain endothelium throughout the entire brain and within cells of the choroid plexus located in the lateral brain ventricles. By use of co-localization studies for the first time a leptin-induced nuclear STAT3-translocation in neurons of various hypothalamic nuclei (vast majority of responding cells), some endothelial cells and cells of the choroid plexus is shown. This

observation, without any doubt, provides evidence for a functional role of neurons as well as non-neuronal target cells in the mediation of leptin-induced functions.

It is further shown for the first time on the cellular level that besides leptin-induced hypothalamic STAT3-activation, leptin was also capable to induce STAT5-activation within the rat hypothalamus. The STAT5-response due to i.c.v.-stimulation, however, was less convincing due to occurrence of some individual variation. While, with the exception of the supraoptic nucleus (SO), centrally leptin-induced STAT5-activation showed almost no difference to the respective control situation 30min after injection. In contrast, systemic leptin treatment revealed marked differences when compared to the control animals. In more detail, systemic leptin treatment induced nuclear STAT5-signals with the strongest response (number of responding cells as well as strength of the immunoreactivity) observed 120-150min after the treatment. In particular the entire ARC (all subnuclei), the PMV, the SO, the tuberomammillary nucleus (TM) and the RCH showed a nuclear STAT5 translocation. Co-localization studies revealed that a high percentage (80-90%) of those STAT5-responsive cells proved to be neurons. Besides STAT5-positive neurons, some astrocytes within the ARC and ependymal cells of the third ventricle also showed a leptin-induced nuclear STAT5 translocation.

To exclude a potential contribution of other cytokines in the activation of the JAK-STAT3- or JAK-STAT5-signalling pathway, we measured plasma concentrations of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor (TNF). Both cytokines showed no elevated plasma levels during systemic leptin-stimulation. In contrast, all systemically leptin-treated rats showed at least a 45fold higher plasma leptin concentration when compared to the respective control animals.

In conclusion, it seems that within the rat hypothalamus, leptin can exert its function via the activation of both STAT3 and STAT5. Leptin-induced hypothalamic STAT-analysis showed a distinct pattern of functionally activated target cells for both transcription factors. Besides neurons other non-neuronal cells such as endothelial cells, astrocytes, ependymal cells and cells of the choroid plexus seem to express functional leptin receptors and might thereby mediate leptin-dependent functions in the rat brain.

## 6. KAPITEL

### Abkürzungsverzeichnis

|                       |  |                          |   |
|-----------------------|--|--------------------------|---|
| * .....               | signifikant ( $p < 0,05$ )                                 | CVOs .....               | zirkumventrikuläre Organe   |
| *** .....             | signifikant ( $p < 0,001$ )                                | Cy <sup>TM</sup> 3 ..... | Carbocyanin   |
| $\alpha_{1,2}$ .....  | (nor-) adrenerge Rezeptoren                                | Cys .....                | Cystein   |
| $\alpha$ -MSH .....   | alpha-Melanozyten-<br>stimulierendes Hormon                | db .....                 | Leptin-Rezeptor-Gen   |
| aCSF .....            | artifizielle Zerebrospinal-<br>Flüssigkeit                 | DAB .....                | 3,3-Diaminobenzidin-<br>Tetrahydrochlorid   |
| ACTH .....            | Adrenocorticotropes-Hormon                                 | DAPI .....               | 4',6-Diamidino-2-Diphenyl-<br>Indoldilaktat, Kernfärbung                                |
| Ag .....              | Antigen  | DIO .....                | „diat induced obesity“  |
| AgRP .....            | „Agouti related peptide“                                   | DMH .....                | <i>Nucleus hypothalamicus</i><br><i>dorsomedialis</i>                                   |
| Ak .....              | Antikörper   | DMH-C .....              | kompakter Subkern des DMH   |
| ANOVA .....           | Varianzanalyse   | DMH-D .....              | dorsaler Subkern des DMH  |
| AP .....              | <i>Area postrema</i>                                       | DMH-V .....              | ventraler Subkern des DMH   |
| APRE .....            | „acute phase responsive<br>elements“                       | DNA .....                | Desoxyribonukleinsäure  |
| ARC .....             | <i>Nucleus arcuatus</i>                                    | ERK .....                | „extracellular signal regulated<br>kinase“  |
| ARC-D .....           | dorsaler Subkern des ARC                                   | f .....                  | <i>Fornix</i>   |
| ARC-L .....           | lateral Subkern des ARC                                    | fa/fa .....              | Leptin-Rezeptor-Defekt  |
| ARC-M .....           | medialer Subkern des ARC                                   | FCS .....                | fetales Kälberserum   |
| ATP .....             | Adenosin-Triphosphat                                       | FITC .....               | Fluorescein-Isothiocyanate  |
| AVPe .....            | <i>Nucleus periventricularis</i><br><i>anteriolaterale</i> | FOS .....                | felines Osteosarkomvirus-<br>Onkogen Struktur-ähnliches<br>Peptid, Transkriptionsfaktor |
| AZ .....              | ausgezählte Zellen   | FSH .....                | Follikel-stimulierendes<br>Hormon   |
| $\beta_{1,2,3}$ ..... | (nor-) adrenerge Rezeptoren                                | GABA .....               | $\gamma$ -Aminobuttersäure  |
| BDNF .....            | „brain derived neurotrophic<br>factor“                     | GAL .....                | Galanin   |
| BFG .....             | braunes Fettgewebe   | GALP .....               | „galanin like peptide“  |
| cAMP .....            | zyklisches Adenosinmono-<br>phosphat                       | GAS .....                | $\gamma$ -aktivierende Sequenz  |
| CART .....            | „cocaine und amphetamine<br>regulated transcript“          | G-CSF .....              | „granulocyte colonie<br>stimulating factor“   |
| c-fos .....           | FOS-Gen  | GFAP .....               | „glial fibrillary acidic<br>protein“, Zellmarker für<br>Astrozyten                      |
| CIS .....             | „cytokine induced SH-2-<br>protein“                        | GH .....                 | „growth hormone“  |
| CNTF .....            | „ciliary neurotrophic factor“                              | GHRH .....               | „growth hormone releasing<br>hormone“   |
| CPU .....             | <i>Caudate putamen</i>                                     | Gln .....                | Glutamin  |
| CREB .....            | „cAMP responsive element<br>binding protein“               | GLP-1 .....              | „glukagon like peptide-1“   |
| CRH .....             | „corticotropin releasing<br>hormone“                       |                          |   |

|                         |  |               |  |
|-------------------------|--|---------------|--|
| Glu.....                | Glutamat   | MTT.....      | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-<br>2,5 Diphenyl-Tetrazolium-<br>bromid |
| GnRH.....               | „gonadotropin releasing<br>hormone“                                | n.d. ....     | nicht detektierbar, unterhalb<br>der Nachweisgrenze                  |
| gp130.....              | Glykoprotein 130   | NES.....      | nukleäre Export Signale für<br>STAT-Faktoren                         |
| GRE.....                | „glucocorticoid responsive<br>element“                             | NeuN.....     | Neuronen-spezifisches<br>nukleäres Protein                           |
| hGH.....                | humanes Wachstumshormon  | NHS.....      | Normal Horse Serum   |
| HiF.....                | <i>Fissura hippocampi</i>  | NK-Zelle..... | natürliche Killerzelle   |
| hrIL-6.....             | humanes rekombinantes IL-6   | n.n. ....     | nicht belegt, keine Tiere  |
| HRP.....                | „horseradish peroxidase“   | NPY.....      | Neuropeptid-Y  |
| 5-HT.....               | Serotonin  | NPY Y.....    | NPY-Rezeptor   |
| HVL.....                | Hypophysen-Vorderlappen  | NSB.....      | nicht spezifisch gebundene<br>Aktivität                              |
| i.c.v.....              | intracerebroventrikulär  | NTS.....      | <i>Nucleus tractus solitarius</i>                                    |
| IFN.....                | Interferon   | ob.....       | Leptin-Gen („obese gene“)  |
| IGF.....                | „insulin like growth factor“                                       | Ob-R.....     | Leptin-Rezeptoren  |
| IGF-1.....              | „insulin like growth factor-1“                                     | Ob-Ra.....    | kurzer Leptin-Rezeptor   |
| IgG.....                | Immunglobulin-γ  | Ob-Rb.....    | langer, funktioneller Leptin-<br>Rezeptor                            |
| IL.....                 | Interleukin  | Ob-Re.....    | löslicher Leptin-Rezeptor  |
| i.p.....                | intraperitoneal  | OVL.....      | <i>Organum vasculosum</i> der<br><i>Lamina terminalis</i>            |
| IRS.....                | Insulin-Rezeptor-Substrat  | ox.....       | <i>Chiasma opticum</i>   |
| i.v.....                | intravenös   | p.....        | phosphoryliert   |
| JAK.....                | Janus-Kinase   | PAA.....      | <i>Area periarquata</i>  |
| kDa.....                | Kilo Dalton  | PaV.....      | <i>Nucleus paraventricularis</i>                                     |
| KM.....                 | Körpermasse  | PB.....       | 0,1 molarer Phosphat-Puffer  |
| Leu.....                | Leucin   | PBS.....      | Phosphat-gepufferte<br>Kochsalzlösung                                |
| LH.....                 | <i>Area laterale hypothalami</i> ,<br>bzw. luteinisierendes Hormon | PC.....       | <i>Plexus choroideus</i>   |
| LIF.....                | „leucemia inhibiting factor“                                       | PDE.....      | Phosphodiesterase  |
| MAPK.....               | „mitogen activated protein<br>kinase“                              | PDE3B.....    | Phosphodiesterase 3B   |
| MC <sub>3,4</sub> ..... | Melanocortin-Rezeptor  | Pe.....       | <i>Nucleus periventricularis</i>                                     |
| MCH.....                | „melanin concentrating<br>hormone“                                 | PFA.....      | Paraformaldehyd-Lösung   |
| MCPO.....               | <i>Nucleus preopticus<br/>magnocellularis</i>                      | PH.....       | <i>Area hypothalami posterioris</i>                                  |
| ME.....                 | <i>Eminentia mediana</i>   | Phe.....      | Phenylalanin   |
| MHb.....                | <i>Nucleus habenularis medialis</i>                                | PI-3.....     | Phosphoinositol-3  |
| MnPO.....               | <i>Nucleus praeopticus<br/>medianus</i>                            | PIAS.....     | „protein inhibitor of activated<br>STAT“                             |
| MNV.....                | <i>Nucleus dorsomotorius nervi<br/>vagus</i>                       | Pir.....      | <i>Cortex piriformis</i>   |
| MPO.....                | <i>Nucleus praeopticus medialis</i>                                |               |  |
| mRNA.....               | messenger Ribonukleinsäure   |               |  |



|                      |  |                        |  |
|----------------------|--|------------------------|--|
| PMV .....            | <i>Nucleus praemamillaris ventralis</i>            | TRH .....              | „thyreotropine releasing hormone“                      |
| POA .....            | <i>Area praeoptica</i>                             | Trp.....               | Tryptophan   |
| POMC.....            | Proopiomelanocortin                                | TSH.....               | <i>Thyreoidea</i> stimulierendes Hormon (Thyreotropin) |
| PrRP .....           | „prolactin releasing peptide“                      | TYK2 .....             | Tyrosin-Kinase-2                                       |
| PTP-1B .....         | Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B                     | Tyr.....               | Tyrosin  |
| QK .....             | Qualitätskontrolle                                 | T-Zelle .....          | Thymus-Lymphozyt                                       |
| RCH.....             | <i>Area retrochiasmatica</i>                       | UCP.....               | „uncoupling protein“, Thermogenin                      |
| RIA .....            | Radioimmunoassay                                   | V <sub>III</sub> ..... | <i>Ventriculus tertius</i>                             |
| ROb .....            | <i>Nucleus raphe obscurus</i>                      | V <sub>IV</sub> .....  | <i>Ventriculus quartus</i>                             |
| RPa .....            | <i>Nucleus raphe pallidus</i>                      | VIP .....              | vasoaktives intestinales Peptid                        |
| s/s.....             | Genblockade der JAK2-STAT3-Kaskade                 | V <sub>I</sub> .....   | <i>Ventriculus lateralis</i>                           |
| SCh .....            | <i>Nucleus suprachiasmaticus</i>                   | VMH .....              | <i>Nucleus hypothalamicus ventromedialis</i>           |
| Ser.....             | Serin  | VMPO .....             | <i>Nucleus praeopticus ventromedialis</i>              |
| SFO.....             | <i>Organum subfornicale</i>                        | vW.....                | von-Willebrand-Faktor                                  |
| SH-2 .....           | „src-homology-2“                                   | WFG .....              | weißes Fettgewebe                                      |
| SHP-2 .....          | „SH-2 containing tyrosine phosphatase“             | ZNS.....               | Zentralnervensystem                                    |
| SIE.....             | „sis inducible elements“                           |                        |  |
| sis.....             | Onkogen  |                        |  |
| SNA.....             | sympathische Nerv-Aktivität                        |                        |  |
| SO .....             | <i>Nucleus supraopticus</i>                        |                        |  |
| SOCS.....            | „supressor of cytokine signaling“                  |                        |  |
| Sol.....             | <i>Nucleus tractus solitarius</i>                  |                        |  |
| SolC.....            | <i>Nucleus tractus solitarius commissuralis</i>    |                        |  |
| sox .....            | <i>Decussatio supraoptici</i>                      |                        |  |
| SP-1 .....           | „specific protein-1“                               |                        |  |
| SPVZ .....           | subparaventriculäre Zone                           |                        |  |
| src .....            | Rous-Sarkomvirus-Onkogen-ähnliches Peptid          |                        |  |
| STAT .....           | „signal transducer and activator of transcription“ |                        |  |
| t.....               | Zeit (min)   |                        |  |
| T <sub>3</sub> ..... | Trijodthyronin                                     |                        |  |
| T <sub>4</sub> ..... | Thyroxin   |                        |  |
| TM.....              | <i>Nucleus tuberomamillaris</i>                    |                        |  |
| TNF .....            | Tumor-Nekrose-Faktor                               |                        |  |
| TNF- $\alpha$ .....  | Tumor-Nekrose-Faktor-alpha                         |                        |  |
| TO.....              | totale Aktivität                                   |                        |  |

## 7. KAPITEL: Literaturverzeichnis

1. **Aarden, L. A., E. R. De Groot, O. L. Schaap, and P. M. Lansdorp. 1987.** Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* 17: 1411-6.
2. **Ahima, R. S., and J. S. Flier. 2000.** Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-37.
3. **Ahima, R. S., D. Prabakaran, and J. S. Flier. 1998.** Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 101: 1020-7.
4. **Ahima, R. S., J. Kelly, J. K. Elmquist, and J. S. Flier. 1999.** Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 140: 4923-31.
5. **Ahima, R. S., C. B. Saper, J. S. Flier, and J. K. Elmquist. 2000.** Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21: 263-307.
6. **Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier, and J. S. Flier. 1996.** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-2.
7. **Akabayashi, A., C. T. Zaia, S. M. Gabriel, I. Silva, W. K. Cheung, and S. F. Leibowitz. 1994.** Intracerebroventricular injection of dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increases hypothalamic levels of neuropeptide Y. *Brain Res* 660: 323-8.
8. **Arase, K., D. A. York, H. Shimizu, N. Shargill, and G. A. Bray. 1988.** Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 255: E255-9.
9. **Arletti, R., A. Benelli, and A. Bertolini. 1989.** Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides* 10: 89-93.
10. **Arletti, R., A. Benelli, and A. Bertolini. 1990.** Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol Behav* 48: 825-30.
11. **Arora, T., B. Liu, H. He, J. Kim, T. L. Murphy, K. M. Murphy, R. L. Modlin, and K. Shuai. 2003.** PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278: 21327-30.
12. **Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel, and M. J. Lewin. 1998.** The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-3.
13. **Bahrenberg, G., I. Behrmann, A. Barthel, P. Hekerman, P. C. Heinrich, H. G. Joost, and W. Becker. 2002.** Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol* 16: 859-72.
14. **Bamshad, M., C. K. Song, and T. J. Bartness. 1999.** CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276: R1569-78.
15. **Banks, A. S., S. M. Davis, S. H. Bates, and M. G. Myers, Jr. 2000.** Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275: 14563-72.
16. **Banks, W. A. 2001.** Leptin transport across the blood-brain barrier: implications for the cause and treatment of obesity. *Curr Pharm Des* 7: 125-33.
17. **Banks, W. A. 2004.** The many lives of leptin. *Peptides* 25: 331-8.
18. **Banks, W. A., A. J. Kastin, W. Huang, J. B. Jaspan, and L. M. Maness. 1996.** Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17: 305-11.
19. **Banks, W. A., R. N. McLay, A. J. Kastin, U. Sarmiento, and S. Scully. 1999.** Passage of leptin across the blood-testis barrier. *Am J Physiol* 276: E1099-104.
20. **Banks, W. A., A. B. Coon, S. M. Robinson, A. Moinuddin, J. M. Shultz, R. Nakaoke, and J. E. Morley. 2004.** Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53: 1253-60.

21. **Barr, V. A., K. Lane, and S. I. Taylor. 1999.** Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* 274: 21416-24.
22. **Baskin, D. G., J. F. Breininger, and M. W. Schwartz. 1999a.** Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48: 828-33.
23. **Baskin, D. G., J. F. Breininger, S. Bonigut, and M. A. Miller. 1999b.** Leptin binding in the arcuate nucleus is increased during fasting. *Brain Res* 828: 154-8.
24. **Baskin, D. G., R. J. Seeley, J. L. Kuijper, S. Lok, D. S. Weigle, J. C. Erickson, R. D. Palmiter, and M. W. Schwartz. 1998.** Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes* 47: 538-43.
25. **Baskin, D. G., M. W. Schwartz, R. J. Seeley, S. C. Woods, D. Porte, Jr., J. F. Breininger, Z. Jonak, J. Schaefer, M. Krouse, C. Burghardt, L. A. Campfield, P. Burn, and J. P. Kochan. 1999c.** Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *J Histochem Cytochem* 47: 353-62.
26. **Bates, S. H., and M. G. Myers. 2004.** The role of leptin - STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. *J Mol Med* 82: 12-20.
27. **Baumann, H., K. K. Morella, D. W. White, M. Dembski, P. S. Bailon, H. Kim, C. F. Lai, and L. A. Tartaglia. 1996.** The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8374-8.
28. **Bayer, L., G. Mairet-Coello, P. Y. Risold, and B. Griffond. 2002.** Orexin/hypocretin neurons: chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons. *Regul Pept* 104: 33-9.
29. **Bazan, J. F. 1989.** A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 788-95.
30. **Beck, B., and S. Richy. 1999.** Hypothalamic hypocretin/orexin and neuropeptide Y: divergent interaction with energy depletion and leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 119-22.
31. **Bendinelli, P., P. Maroni, F. Pecori Giralidi, and R. Piccoletti. 2000.** Leptin activates Stat3, Stat1 and AP-1 in mouse adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 168: 11-20.
32. **Bernardis, L. L., and L. L. Bellinger. 1987.** The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res* 434: 321-81.
33. **Bhattacharya, S., and C. Schindler. 2003.** Regulation of Stat3 nuclear export. *J Clin Invest* 111: 553-9.
34. **Bild, A. H., J. Turkson, and R. Jove. 2002.** Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *Embo J* 21: 3255-63.
35. **Billington, C. J., J. E. Briggs, M. Grace, and A. S. Levine. 1991.** Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260: R321-7.
36. **Billington, C. J., J. E. Briggs, S. Harker, M. Grace, and A. S. Levine. 1994.** Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266: R1765-70.
37. **Bittencourt, J. C., F. Presse, C. Arias, C. Peto, J. Vaughan, J. L. Nahon, W. Vale, and P. E. Sawchenko. 1992.** The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 319: 218-45.
38. **Bjorbaek, C., S. Uotani, B. da Silva, and J. S. Flier. 1997.** Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 32686-95.
39. **Bjorbaek, C., K. El-Haschimi, J. D. Frantz, and J. S. Flier. 1999.** The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274: 30059-65.

40. **Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, J. D. Frantz, S. E. Shoelson, and J. S. Flier. 1998a.** Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1: 619-25.
41. **Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, P. Michl, R. S. Ahima, A. van Bueren, A. L. McCall, and J. S. Flier. 1998b.** Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139: 3485-91.
42. **Bjorbaek, C., R. M. Buchholz, S. M. Davis, S. H. Bates, D. D. Pierroz, H. Gu, B. G. Neel, M. G. Myers, Jr., and J. S. Flier. 2001.** Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem* 276: 4747-55.
43. **Blake, N. G., D. J. Eckland, O. J. Foster, and S. L. Lightman. 1991.** Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129: 2714-8.
44. **Blevins, J. E., M. E. Schwartz, and D. G. Baskin. 2002.** Fourth ventricular administration of an oxytocin receptor antagonist stimulates food intake in rats. *Society for Neuroscience Online* 2002.
45. **Bornstein, S. R., K. Uhlmann, A. Haidan, M. Ehrhart-Bornstein, and W. A. Scherbaum. 1997.** Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46: 1235-8.
46. **Bousquet, C., M. C. Zatelli, and S. Melmed. 2000.** Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 106: 1417-25.
47. **Briscoe, C. P., S. Hanif, J. R. Arch, and M. Tadayyon. 2001.** Fatty acids inhibit leptin signalling in BRIN-BD11 insulinoma cells. *J Mol Endocrinol* 26: 145-54.
48. **Broberger, C. 1999.** Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 848: 101-13.
49. **Broberger, C., L. De Lecea, J. G. Sutcliffe, and T. Hokfelt. 1998a.** Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402: 460-74.
50. **Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling, and T. Hokfelt. 1998b.** The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15043-8.
51. **Browning, J. L., A. Ngam-ek, P. Lawton, J. DeMarinis, R. Tizard, E. P. Chow, C. Hession, B. O'Brine-Greco, S. F. Foley, and C. F. Ware. 1993.** Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72: 847-56.
52. **Buitenhuis, M., P. J. Coffey, and L. Koenderman. 2004.** Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2120-4.
53. **Bunting, K. D., H. L. Bradley, T. S. Hawley, R. Moriggl, B. P. Sorrentino, and J. N. Ihle. 2002.** Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. *Blood* 99: 479-87.
54. **Burcelin, R., B. Thorens, M. Glauser, R. C. Gaillard, and F. P. Pralong. 2003.** Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. *Endocrinology* 144: 4484-91.
55. **Burguera, B., M. E. Couce, G. L. Curran, M. D. Jensen, R. V. Lloyd, M. P. Cleary, and J. F. Poduslo. 2000.** Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes* 49: 1219-23.
56. **Cai, X. J., P. S. Widdowson, J. Harrold, S. Wilson, R. E. Buckingham, J. R. Arch, M. Tadayyon, J. C. Clapham, J. Wilding, and G. Williams. 1999.** Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48: 2132-7.

57. **Campbell, R. E., J. M. French-Mullen, M. A. Cowley, M. S. Smith, and K. L. Grove. 2001.** Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via the Y5 receptor subtype. *Neuroendocrinology* 74: 106-19.
58. **Campfield, L. A., and F. J. Smith. 1998.** Overview: neurobiology of OB protein (leptin). *Proc Nutr Soc* 57: 429-40.
59. **Campfield, L. A., F. J. Smith, L. Penicaud, and P. Burn. 1997.** OB protein and its receptor: signal transduction between adipose tissue and central nervous system. *Annu Diabetol*: 131-48.
60. **Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos, and P. Burn. 1995.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-9.
61. **Cano, G., A. M. Passerin, J. C. Schiltz, J. P. Card, S. F. Morrison, and A. F. Sved. 2003.** Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol* 460: 303-26.
62. **Canteras, N. S., R. B. Simerly, and L. W. Swanson. 1992.** Projections of the ventral premammillary nucleus. *J Comp Neurol* 324: 195-212.
63. **Canteras, N. S., R. B. Simerly, and L. W. Swanson. 1994.** Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 348: 41-79.
64. **Caro, J. F., J. W. Kolaczynski, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, I. Opentanova, W. H. Goldman, R. B. Lynn, P. L. Zhang, M. K. Sinha, and R. V. Considine. 1996.** Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-61.
65. **Carpenter, L. R., T. J. Farruggella, A. Symes, M. L. Karow, G. D. Yancopoulos, and N. Stahl. 1998.** Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6061-6.
66. **Carro, E., R. Senaris, R. V. Considine, F. F. Casanueva, and C. Dieguez. 1997a.** Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 138: 2203-6.
67. **Carro, E., L. Pinilla, L. M. Seoane, R. V. Considine, E. Aguilar, F. F. Casanueva, and C. Dieguez. 1997b.** Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. *Neuroendocrinology* 66: 375-7.
68. **Carro, E., R. M. Senaris, L. M. Seoane, L. A. Frohman, A. Arimura, F. F. Casanueva, and C. Dieguez. 1999.** Role of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin on leptin-induced GH secretion. *Neuroendocrinology* 69: 3-10.
69. **Carvalho, J. B., E. B. Ribeiro, F. Folli, L. A. Velloso, and M. J. Saad. 2003.** Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biol Chem* 384: 151-9.
70. **Cechetto, D. F., and C. B. Saper. 1988.** Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 272: 579-604.
71. **Chaffer, C. L., and M. J. Morris. 2002.** The feeding response to melanin-concentrating hormone is attenuated by antagonism of the NPY Y(1)-receptor in the rat. *Endocrinology* 143: 191-7.
72. **Chang, R. L., W. M. Deen, C. R. Robertson, and B. M. Brenner. 1975.** Permeability of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int* 8: 212-8.
73. **Chatterjee-Kishore, M., K. L. Wright, J. P. Ting, and G. R. Stark. 2000.** How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J* 19: 4111-22.
74. **Chaudhuri, A. 1997.** Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport* 8: v-ix.
75. **Chehab, F. F., M. E. Lim, and R. Lu. 1996.** Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12: 318-20.

76. **Chen, A. S., J. M. Metzger, M. E. Trumbauer, X. M. Guan, H. Yu, E. G. Frazier, D. J. Marsh, M. J. Forrest, S. Gopal-Truter, J. Fisher, R. E. Camacho, A. M. Strack, T. N. Mellin, D. E. MacIntyre, H. Y. Chen, and L. H. Van der Ploeg. 2000.** Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res* 9: 145-54.
77. **Chen, X. M., T. Hosono, T. Yoda, Y. Fukuda, and K. Kanosue. 1998.** Efferent projection from the preoptic area for the control of non-shivering thermogenesis in rats. *J Physiol* 512 ( Pt 3): 883-92.
78. **Cheng, A., N. Uetani, P. D. Simoncic, V. P. Chaubey, A. Lee-Loy, C. J. McGlade, B. P. Kennedy, and M. L. Tremblay. 2002.** Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2: 497-503.
79. **Cheung, C. C., D. K. Clifton, and R. A. Steiner. 1997.** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138: 4489-92.
80. **Chua, S. C., Jr., I. K. Koutras, L. Han, S. M. Liu, J. Kay, S. J. Young, W. K. Chung, and R. L. Leibel. 1997.** Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics* 45: 264-70.
81. **Chung, C. D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta, and K. Shuai. 1997.** Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278: 1803-5.
82. **Cinti, S., R. C. Frederich, M. C. Zingaretti, R. De Matteis, J. S. Flier, and B. B. Lowell. 1997.** Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology* 138: 797-804.
83. **Cocchi, D., V. De Gennaro Colonna, M. Bagnasco, D. Bonacci, and E. E. Muller. 1999.** Leptin regulates GH secretion in the rat by acting on GHRH and somatostatinergic functions. *J Endocrinol* 162: 95-9.
84. **Coleman, D. L. 1973.** Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9: 294-8.
85. **Coleman, D. L., and K. P. Hummel. 1969.** Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol* 217: 1298-304.
86. **Considine, R. V., and J. F. Caro. 1997.** Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1255-72.
87. **Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer, and J. F. Caro. 1996.** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-5.
88. **Coons, A. H. 1958.** Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1: 399-422.
89. **Corp, E. S., D. B. Conze, F. Smith, and L. A. Campfield. 1998.** Regional localization of specific [125I]leptin binding sites in rat forebrain. *Brain Res* 789: 40-7.
90. **Correia, M. L., D. A. Morgan, J. L. Mitchell, W. I. Sivitz, A. L. Mark, and W. G. Haynes. 2001.** Role of corticotrophin-releasing factor in effects of leptin on sympathetic nerve activity and arterial pressure. *Hypertension* 38: 384-8.
91. **Costa, A., A. Poma, E. Martignoni, G. Nappi, E. Ur, and A. Grossman. 1997.** Stimulation of corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. *Neuroreport* 8: 1131-4.
92. **Couceyro, P. R., E. O. Koylu, and M. J. Kuhar. 1997.** Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat* 12: 229-41.
93. **Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdan, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone, and M. J. Low. 2001.** Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411: 480-4.
94. **Cumin, F., H. P. Baum, and N. Levens. 1996.** Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 1120-6.
95. **Cumin, F., H. P. Baum, and N. Levens. 1997a.** Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J Endocrinol* 155: 577-85.

96. **Cumin, F., H. P. Baum, M. de Gasparo, and N. Levens. 1997b.** Removal of endogenous leptin from the circulation by the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21: 495-504.
97. **Currie, P. J., and D. V. Coscina. 1997.** Stimulation of 5-HT(2A/2C) receptors within specific hypothalamic nuclei differentially antagonizes NPY-induced feeding. *Neuroreport* 8: 3759-62.
98. **Currie, P. J., D. V. Coscina, C. Bishop, C. D. Coiro, G. F. Koob, J. Rivier, and W. Vale. 2001.** Hypothalamic paraventricular nucleus injections of urocortin alter food intake and respiratory quotient. *Brain Res* 916: 222-8.
99. **Dallman, M. F. 1984.** Viewing the ventromedial hypothalamus from the adrenal gland. *Am J Physiol* 246: R1-12.
100. **Darnell Jr., J. E., I. M. Kerr, and G. R. Stark. 1994.** Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-21.
101. **Date, Y., Y. Ueta, H. Yamashita, H. Yamaguchi, S. Matsukura, K. Kangawa, T. Sakurai, M. Yanagisawa, and M. Nakazato. 1999.** Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 748-53.
102. **De Vos, P., A. M. Lefebvre, I. Shriver, J. C. Fruchart, and J. Auwerx. 1998.** Glucocorticoids induce the expression of the leptin gene through a non-classical mechanism of transcriptional activation. *Eur J Biochem* 253: 619-26.
103. **Dessolin, S., M. Schalling, O. Champigny, F. Lonnqvist, G. Ailhaud, C. Dani, and D. Ricquier. 1997.** Leptin gene is expressed in rat brown adipose tissue at birth. *Faseb J* 11: 382-7.
104. **Devos, R., Y. Guisez, J. Van der Heyden, D. W. White, M. Kalai, M. Fountoulakis, and G. Plaetinck. 1997.** Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem* 272: 18304-10.
105. **Dhandapani, K. M., V. B. Mahesh, and D. W. Brann. 2003.** Astrocytes and brain function: implications for reproduction. *Exp Biol Med* 228: 253-60.
106. **Douglass, J., A. A. McKinzie, and P. Couceyro. 1995.** PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15: 2471-81.
107. **Dunbar, J. C., and H. Lu. 2000.** Proopiomelanocortin (POMC) products in the central regulation of sympathetic and cardiovascular dynamics: studies on melanocortin and opioid interactions. *Peptides* 21: 211-7.
108. **Ebihara, K., Y. Ogawa, G. Katsuura, Y. Numata, H. Masuzaki, N. Satoh, M. Tamaki, T. Yoshioka, M. Hayase, N. Matsuoka, M. Aizawa-Abe, Y. Yoshimasa, and K. Nakao. 1999.** Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* 48: 2028-33.
109. **Edwards, C. M., S. Abusnana, D. Sunter, K. G. Murphy, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1999.** The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 160: R7-12.
110. **Egawa, M., H. Yoshimatsu, and G. A. Bray. 1990.** Preoptic area injection of corticotropin-releasing hormone stimulates sympathetic activity. *Am J Physiol* 259: R799-806.
111. **Egawa, M., H. Yoshimatsu, and G. A. Bray. 1991.** Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* 260: R328-34.
112. **El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, S. M. Hileman, C. Bjorbaek, and J. S. Flier. 2000.** Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 105: 1827-32.
113. **Elias, C. F., J. F. Kelly, C. E. Lee, R. S. Ahima, D. J. Drucker, C. B. Saper, and J. K. Elmquist. 2000.** Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 423: 261-81.

114. **Elias, C. F., C. E. Lee, J. F. Kelly, R. S. Ahima, M. Kuhar, C. B. Saper, and J. K. Elmquist. 2001.** Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol* 432: 1-19.
115. **Elias, C. F., C. Lee, J. Kelly, C. Aschkenasi, R. S. Ahima, P. R. Couceyro, M. J. Kuhar, C. B. Saper, and J. K. Elmquist. 1998a.** Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21: 1375-85.
116. **Elias, C. F., C. Aschkenasi, C. Lee, J. Kelly, R. S. Ahima, C. Bjorbaek, J. S. Flier, C. B. Saper, and J. K. Elmquist. 1999.** Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775-86.
117. **Elias, C. F., C. B. Saper, E. Maratos-Flier, N. A. Tritos, C. Lee, J. Kelly, J. B. Tatro, G. E. Hoffman, M. M. Ollmann, G. S. Barsh, T. Sakurai, M. Yanagisawa, and J. K. Elmquist. 1998b.** Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402: 442-59.
118. **Ellacott, K. L., C. B. Lawrence, N. J. Rothwell, and S. M. Luckman. 2002.** PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight. *Endocrinology* 143: 368-74.
119. **Ellacott, K. L., C. B. Lawrence, L. E. Pritchard, and S. M. Luckman. 2003.** Repeated administration of the anorectic factor prolactin-releasing peptide leads to tolerance to its effects on energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R1005-10.
120. **Elmquist, J. K., C. F. Elias, and C. B. Saper. 1999.** From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-32.
121. **Elmquist, J. K., R. S. Ahima, E. Maratos-Flier, J. S. Flier, and C. B. Saper. 1997.** Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138: 839-42.
122. **Elmquist, J. K., C. Bjorbaek, R. S. Ahima, J. S. Flier, and C. B. Saper. 1998a.** Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395: 535-47.
123. **Elmquist, J. K., R. S. Ahima, C. F. Elias, J. S. Flier, and C. B. Saper. 1998b.** Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 741-6.
124. **Elsholtz, H. P., A. M. Lew, P. R. Albert, and V. C. Sundmark. 1991.** Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *J Biol Chem* 266: 22919-25.
125. **Endo, T. A., M. Masuhara, M. Yokouchi, R. Suzuki, H. Sakamoto, K. Mitsui, A. Matsumoto, S. Tanimura, M. Ohtsubo, H. Misawa, T. Miyazaki, N. Leonor, T. Taniguchi, T. Fujita, Y. Kanakura, S. Komiya, and A. Yoshimura. 1997.** A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387: 921-4.
126. **Escobar-Morreale, H. F., F. Escobar del Rey, and G. Morreale de Escobar. 1997.** Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 138: 4485-8.
127. **Eskandari, M. K., D. T. Nguyen, S. L. Kunkel, and D. G. Remick. 1990.** WEHI 164 subclone 13 assay for TNF: sensitivity, specificity, and reliability. *Immunol Invest* 19: 69-79.
128. **Espevik, T., and J. Nissen-Meyer. 1986.** A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95: 99-105.
129. **Ewart-Toland, A., K. Mounzih, J. Qiu, and F. F. Chehab. 1999.** Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. *Endocrinology* 140: 732-8.
130. **Eyckerman, S., W. Waelput, A. Verhee, D. Broekaert, J. Vandekerckhove, and J. Tavernier. 1999.** Analysis of Tyr to Phe and fa/fa leptin receptor mutations in the PC12 cell line. *Eur Cytokine Netw* 10: 549-56.
131. **Fan, W., B. A. Boston, R. A. Kesterson, V. J. Hruby, and R. D. Cone. 1997.** Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385: 165-8.
132. **Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, C. Zhao, R. Darnell, and J. M. Friedman. 1997.** Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7001-5.



133. **Fekete, C., and Z. Liposits. 2003.** Histamine-immunoreactive neurons of the tuberomammillary nucleus are innervated by alpha-melanocyte stimulating hormone-containing axons. Generation of a new histamine antiserum for ultrastructural studies. *Brain Res* 969: 70-7.
134. **Fekete, C., G. Wittmann, Z. Liposits, and R. M. Lechan. 2002a.** GABA-ergic innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* 957: 251-8.
135. **Fekete, C., G. Wittmann, Z. Liposits, and R. M. Lechan. 2004.** Origin of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)-immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol* 469: 340-50.
136. **Fekete, C., G. Legradi, E. Mihaly, J. B. Tatro, W. M. Rand, and R. M. Lechan. 2000a.** alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* 289: 152-6.
137. **Fekete, C., S. Sarkar, W. M. Rand, J. W. Harney, C. H. Emerson, A. C. Bianco, and R. M. Lechan. 2002b.** Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology* 143: 3846-53.
138. **Fekete, C., G. Legradi, E. Mihaly, Q. H. Huang, J. B. Tatro, W. M. Rand, C. H. Emerson, and R. M. Lechan. 2000b.** alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci* 20: 1550-8.
139. **Fekete, C., J. Kelly, E. Mihaly, S. Sarkar, W. M. Rand, G. Legradi, C. H. Emerson, and R. M. Lechan. 2001.** Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 142: 2606-13.
140. **Fiers, W. 1991.** Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285: 199-212.
141. **Fong, T. M., C. Mao, T. MacNeil, R. Kalyani, T. Smith, D. Weinberg, M. R. Tota, and L. H. Van der Ploeg. 1997.** ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 629-31.
142. **Fong, T. M., R. R. Huang, M. R. Tota, C. Mao, T. Smith, J. Varnerin, V. V. Karpitskiy, J. E. Krause, and L. H. Van der Ploeg. 1998.** Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol* 53: 234-40.
143. **Foster, D. O., F. Depocas, and M. Zuker. 1982.** Heterogeneity of the sympathetic innervation of rat interscapular brown adipose tissue via intercostal nerves. *Can J Physiol Pharmacol* 60: 747-54.
144. **Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B. B. Lowell, and J. S. Flier. 1995.** Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1: 1311-4.
145. **Freeman, M. E., B. Kanyicska, A. Lerant, and G. Nagy. 2000.** Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523-631.
146. **Friedman, J. M. 1997.** The alphabet of weight control. *Nature* 385: 119-20.
147. **Friedman, J. M., and J. L. Halaas. 1998.** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-70.
148. **Frohman, L. A., and L. L. Bernardis. 1971.** Effect of hypothalamic stimulation on plasma glucose, insulin, and glucagon levels. *Am J Physiol* 221: 1596-603.
149. **Funahashi, H., S. Yamada, H. Kageyama, F. Takenoya, J. L. Guan, and S. Shioda. 2003.** Co-existence of leptin- and orexin-receptors in feeding-regulating neurons in the hypothalamic arcuate nucleus-a triple labeling study. *Peptides* 24: 687-94.
150. **Geerling, J. C., T. C. Mettenleiter, and A. D. Loewy. 2003.** Orexin neurons project to diverse sympathetic outflow systems. *Neuroscience* 122: 541-50.

151. **Ghilardi, N., and R. C. Skoda. 1997.** The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol* 11: 393-9.
152. **Ghilardi, N., S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, M. H. Heim, and R. C. Skoda. 1996.** Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6231-5.
153. **Gill, M. S., A. A. Toogood, J. Jones, P. E. Clayton, and S. M. Shalet. 1999.** Serum leptin response to the acute and chronic administration of growth hormone (GH) to elderly subjects with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1288-95.
154. **Goiot, H., S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, B. Lardeux, T. Lehy, M. J. Lewin, and A. Bado. 2001.** Antral mucosa expresses functional leptin receptors coupled to STAT-3 signaling, which is involved in the control of gastric secretions in the rat. *Gastroenterology* 121: 1417-27.
155. **Golden, P. L., T. J. Maccagnan, and W. M. Pardridge. 1997.** Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest* 99: 14-8.
156. **Gong, D. W., S. Bi, R. E. Pratley, and B. D. Weintraub. 1996.** Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 271: 3971-4.
157. **Gouilleux, F., H. Wakao, M. Mundt, and B. Groner. 1994.** Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J* 13: 4361-9.
158. **Grasso, P., M. C. Leinung, S. P. Ingher, and D. W. Lee. 1997.** In vivo effects of leptin-related synthetic peptides on body weight and food intake in female ob/ob mice: localization of leptin activity to domains between amino acid residues 106-140. *Endocrinology* 138: 1413-8.
159. **Grattan, D. R., J. Xu, M. J. McLachlan, I. C. Kokay, S. J. Bunn, R. C. Hovey, and H. W. Davey. 2001.** Feedback regulation of PRL secretion is mediated by the transcription factor, signal transducer, and activator of transcription 5b. *Endocrinology* 142: 3935-40.
160. **Green, E. D., M. Maffei, V. V. Braden, R. Proenca, U. DeSilva, Y. Zhang, S. C. Chua, Jr., R. L. Leibel, J. Weissenbach, and J. M. Friedman. 1995.** The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res* 5: 5-12.
161. **Grimley, P. M., F. Dong, and H. Rui. 1999.** Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 10: 131-57.
162. **Grunfeld, C., C. Zhao, J. Fuller, A. Pollack, A. Moser, J. Friedman, and K. R. Feingold. 1996.** Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest* 97: 2152-7.
163. **Guan, J. L., T. Saotome, Q. P. Wang, H. Funahashi, T. Hori, S. Tanaka, and S. Shioda. 2001.** Orexinergic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport* 12: 547-51.
164. **Guan, J. L., K. Uehara, S. Lu, Q. P. Wang, H. Funahashi, T. Sakurai, M. Yanagizawa, and S. Shioda. 2002.** Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1523-32.
165. **Guan, X. M., J. F. Hess, H. Yu, P. J. Hey, and L. H. van der Ploeg. 1997.** Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol* 133: 1-7.
166. **Gundlach, A. L. 2002.** Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *Eur J Pharmacol* 440: 255-68.
167. **Guo, D., J. D. Dunbar, C. H. Yang, L. M. Pfeffer, and D. B. Donner. 1998.** Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor. *J Immunol* 160: 2742-50.
168. **Hagan, J. J., R. A. Leslie, S. Patel, M. L. Evans, T. A. Wattam, S. Holmes, C. D. Benham, S. G. Taylor, C. Routledge, P. Hemmati, R. P. Munton, T. E. Ashmeade, A. S. Shah, J. P. Hatcher, P. D. Hatcher, D. N. Jones, M. I. Smith, D. C. Piper, A. J. Hunter, R. A. Porter,**

- and N. Upton. 1999.** Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10911-6.
169. **Hagan, M. M., P. A. Rushing, L. M. Pritchard, M. W. Schwartz, A. M. Strack, L. H. Van Der Ploeg, S. C. Woods, and R. J. Seeley. 2000.** Long-term orexigenic effects of AgRP-(83--132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol* 279: R47-52.
170. **Hahn, T. M., J. F. Breininger, D. G. Baskin, and M. W. Schwartz. 1998.** Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1: 271-2.
171. **Hajdu, I., E. Szentirmai, F. Obal, Jr., and J. M. Krueger. 2003.** Different brain structures mediate drinking and sleep suppression elicited by the somatostatin analog, octreotide, in rats. *Brain Res* 994: 115-23.
172. **Hakansson, M., L. de Lecea, J. G. Sutcliffe, M. Yanagisawa, and B. Meister. 1999.** Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 11: 653-63.
173. **Hakansson, M. L., and B. Meister. 1998.** Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 68: 420-7.
174. **Hakansson, M. L., H. Brown, N. Ghilardi, R. C. Skoda, and B. Meister. 1998.** Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18: 559-72.
175. **Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley, and J. M. Friedman. 1995.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-6.
176. **Hamilton, B. S., D. Paglia, A. Y. Kwan, and M. Deitel. 1995.** Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1: 953-6.
177. **Hansen, J. A., K. Lindberg, D. J. Hilton, J. H. Nielsen, and N. Billestrup. 1999.** Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol Endocrinol* 13: 1832-43.
178. **Hansen, K. R., S. M. Krasnow, M. A. Nolan, G. S. Fraley, J. W. Baumgartner, D. K. Clifton, and R. A. Steiner. 2003.** Activation of the sympathetic nervous system by galanin-like peptide--a possible link between leptin and metabolism. *Endocrinology* 144: 4709-17.
179. **Hardie, L. J., D. V. Rayner, S. Holmes, and P. Trayhurn. 1996.** Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 660-5.
180. **Harré, E. M. 2003.** Die Rolle von Interleukin-6 (IL-6) in der zentralnervös vermittelten Fieberentstehung der Ratte. *Laufersweiler Verlag, Giessen.*
181. **Harré, E. M., J. Roth, R. Gerstberger, and T. Hübschle. 2003.** Interleukin-6 mediates lipopolysaccharide-induced nuclear STAT3 translocation in astrocytes of rat sensory circumventricular organs. *Brain Res* 980: 151-5.
182. **Harré, E. M., J. Roth, U. Pehl, M. Kueth, R. Gerstberger, and T. Hübschle. 2002.** Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. *J Appl Physiol* 92: 2657-66.
183. **Harris, M., C. Aschkenasi, C. F. Elias, A. Chandrankunnel, E. A. Nillni, C. Bjorbaek, J. K. Elmquist, J. S. Flier, and A. N. Hollenberg. 2001.** Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 107: 111-20.
184. **Haskell-Luevano, C., and E. K. Monck. 2001.** Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept* 99: 1-7.
185. **Haspel, R. L., and J. E. Darnell Jr. 1999.** A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10188-93.
186. **Hausberg, M., D. A. Morgan, M. A. Chapleau, W. I. Sivitz, A. L. Mark, and W. G. Haynes. 2002.** Differential modulation of leptin-induced sympathoexcitation by baroreflex activation. *J Hypertens* 20: 1633-41.

187. **Hawkins, M. F. 1986.** Central nervous system neurotensin and feeding. *Physiol Behav* 36: 1-8.
188. **Haynes, A. C., B. Jackson, P. Overend, R. E. Buckingham, S. Wilson, M. Tadayyon, and J. R. Arch. 1999a.** Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20: 1099-105.
189. **Haynes, W. G. 2000.** Interaction between leptin and sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2: 311-8.
190. **Haynes, W. G., D. A. Morgan, A. Djalali, W. I. Sivitz, and A. L. Mark. 1999b.** Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension* 33: 542-7.
191. **He, Y., H. Chen, M. J. Quon, and M. Reitman. 1995.** The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 270: 28887-91.
192. **Hegyi, K., K. Fulop, K. Kovacs, S. Toth, and A. Falus. 2004.** Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 28: 159-69.
193. **Heim, M. H. 1996.** The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus. *Eur J Clin Invest* 26: 1-12.
194. **Heim, M. H., I. M. Kerr, G. R. Stark, and J. E. Darnell, Jr. 1995.** Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267: 1347-9.
195. **Heiman, M. L., R. S. Ahima, L. S. Craft, B. Schoner, T. W. Stephens, and J. S. Flier. 1997.** Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 138: 3859-63.
196. **Heinrichs, S. C., F. Menzaghi, E. M. Pich, R. L. Hauger, and G. F. Koob. 1993.** Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res* 611: 18-24.
197. **Hervey, G. R. 1959.** The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol* 145: 336-52.
198. **Hervieu, G. J., J. E. Cluderay, D. Harrison, J. Meakin, P. Maycox, S. Nasir, and R. A. Leslie. 2000.** The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 12: 1194-216.
199. **Heshka, J. T., and P. J. Jones. 2001.** A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. *Life Sci* 69: 987-1003.
200. **Hileman, S. M., J. Tornoe, J. S. Flier, and C. Bjorbaek. 2000.** Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology* 141: 1955-61.
201. **Hileman, S. M., D. D. Pierroz, H. Masuzaki, C. Bjorbaek, K. El-Haschimi, W. A. Banks, and J. S. Flier. 2002.** Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143: 775-83.
202. **Hill, R. A., S. Margetic, G. G. Pegg, and C. Gazzola. 1998.** Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 765-70.
203. **Hinuma, S., Y. Habata, R. Fujii, Y. Kawamata, M. Hosoya, S. Fukusumi, C. Kitada, Y. Masuo, T. Asano, H. Matsumoto, M. Sekiguchi, T. Kurokawa, O. Nishimura, H. Onda, and M. Fujino. 1998.** A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393: 272-6.
204. **Hoggard, N., L. Hunter, J. S. Duncan, L. M. Williams, P. Trayhurn, and J. G. Mercer. 1997.** Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11073-8.
205. **Honda, K., K. Narita, T. Murata, and T. Higuchi. 2002.** Leptin affects the electrical activity of neurones in the hypothalamic supraoptic nucleus. *Brain Res Bull* 57: 721-5.

206. **Horvath, T. L., S. Diano, and A. N. van den Pol. 1999.** Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19: 1072-87.
207. **Hosoi, T., T. Kawagishi, Y. Okuma, J. Tanaka, and Y. Nomura. 2002.** Brain stem is a direct target for leptin's action in the central nervous system. *Endocrinology* 143: 3498-504.
208. **Houseknecht, K. L., C. S. Mantzoros, R. Kuliawat, E. Hadro, J. S. Flier, and B. B. Kahn. 1996.** Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes* 45: 1638-43.
209. **Hsu, S. M., L. Raine, and H. Fanger. 1981.** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-80.
210. **Huang, X. F., S. Lin, and R. Zhang. 1997.** Upregulation of leptin receptor mRNA expression in obese mouse brain. *Neuroreport* 8: 1035-8.
211. **Hübschle, T. 2004.** Untersuchungen zur hypothalamischen Kontrolle thermoregulatorischer Effektororgane der Ratte. Laufersweiler Verlag, Giessen.
212. **Hübschle, T., E. Thom, A. Watson, J. Roth, S. Klaus, and W. Meyerhof. 2001.** Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci* 21: 2413-24.
213. **Huff, R. L., R. Trautman, and D. C. Van Dyke. 1950.** Nature of exchanges in parabiotic rats. *Am J Physiol* 161: 56-74.
214. **Hukshorn, C. J., and W. H. Saris. 2004.** Leptin and energy expenditure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7: 629-33.
215. **Huo, L., H. Münzberg, E. A. Nillni, and C. Bjorbaek. 2004.** Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic trh gene expression by leptin. *Endocrinology* 145: 2516-23.
216. **Hurd, Y. L., and P. Fagergren. 2000.** Human cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) mRNA is highly expressed in limbic- and sensory-related brain regions. *J Comp Neurol* 425: 583-98.
217. **Hwang, C. S., S. Mandrup, O. A. MacDougald, D. E. Geiman, and M. D. Lane. 1996.** Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 873-7.
218. **Ibata, Y., H. Okamura, S. Makino, F. Kawakami, N. Morimoto, and K. Chihara. 1986.** Light and electron microscopic immunocytochemistry of GRF-like immunoreactive neurons and terminals in the rat hypothalamic arcuate nucleus and median eminence. *Brain Res* 370: 136-43.
219. **Ibata, Y., F. Kawakami, K. Fukui, H. L. Obata-Tsuto, M. Tanaka, T. Kubo, H. Okamura, N. Morimoto, C. Yanaihara, and N. Yanaihara. 1984.** Light and electron microscopic immunocytochemistry of neurotensin-like immunoreactive neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res* 302: 221-30.
220. **Ida, T., K. Nakahara, T. Katayama, N. Murakami, and M. Nakazato. 1999.** Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res* 821: 526-9.
221. **Ingalls, A. M., M. M. Dickie, and G. D. Snell. 1950.** Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 41: 317-8.
222. **Isse, N., Y. Ogawa, N. Tamura, H. Masuzaki, K. Mori, T. Okazaki, N. Satoh, M. Shigemoto, Y. Yoshimasa, S. Nishi, K. Hosoda, J. Inazawa, and K. Nakao. 1995.** Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem* 270: 27728-33.
223. **Itoh, Y., R. Oishi, and K. Saeki. 1991.** Feeding-induced increase in the extracellular concentration of histamine in rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 125: 235-7.

224. **Janik, J. E., B. D. Curti, R. V. Considine, H. C. Rager, G. C. Powers, W. G. Alvord, J. W. Smith, 2nd, B. L. Gause, and W. C. Kopp. 1997.** Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3084-6.
225. **Jeanrenaud, B., and F. Rohner-Jeanrenaud. 2000.** CNS-periphery relationships and body weight homeostasis: influence of the glucocorticoid status. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2: S74-6.
226. **Jin, L., S. Zhang, B. G. Burguera, M. E. Couce, R. Y. Osamura, E. Kulig, and R. V. Lloyd. 2000.** Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 141: 333-9.
227. **Jin, X., N. Fukuda, J. Su, H. Takagi, Y. Lai, Z. Lin, K. Kanmatsuse, Z. W. Wang, and R. H. Unger. 2003.** Effects of leptin on endothelial function with OB-Rb gene transfer in Zucker fatty rats. *Atherosclerosis* 169: 225-33.
228. **Kalra, S. P., and P. S. Kalra. 2003.** Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin. *Endocrine* 22: 49-56.
229. **Kalra, S. P., M. G. Dube, S. Pu, B. Xu, T. L. Horvath, and P. S. Kalra. 1999.** Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20: 68-100.
230. **Kastin, A. J., V. Akerstrom, and L. Hackler. 2001.** Food deprivation decreases blood galanin-like peptide and its rapid entry into the brain. *Neuroendocrinology* 74: 423-32.
231. **Kastin, A. J., W. Pan, V. Akerstrom, L. Hackler, C. Wang, and C. M. Kotz. 2002.** Novel peptide-peptide cooperation may transform feeding behavior. *Peptides* 23: 2189-96.
232. **Kasubowska, W., H. D. Falls, V. G. Schaefer, D. Haasch, L. Frost, P. Hessler, P. E. Kroeger, D. W. White, M. R. Jirousek, and J. M. Trevillyan. 2002.** Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol* 195: 109-18.
233. **Kawano, H., and S. Daikoku. 1987.** Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 265: 242-53.
234. **Kennedy, A., T. W. Gettys, P. Watson, P. Wallace, E. Ganaway, Q. Pan, and W. T. Garvey. 1997.** The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1293-300.
235. **Kennedy, A. R., J. F. Todd, S. A. Stanley, C. R. Abbott, C. J. Small, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2001.** Melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses thyroid stimulating hormone (TSH) release, in vivo and in vitro, via the hypothalamus and the pituitary. *Endocrinology* 142: 3265-8.
236. **Kennedy, G. C. 1953.** The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140: 578-96.
237. **Kernie, S. G., D. J. Liebl, and L. F. Parada. 2000.** BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *Embo J* 19: 1290-300.
238. **Kiss, J. Z., M. D. Cassell, and M. Palkovits. 1984.** Analysis of the ACTH/beta-End/alpha-MSH-immunoreactive afferent input to the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *Brain Res* 324: 91-9.
239. **Kloek, C., A. K. Haq, S. L. Dunn, H. J. Lavery, A. S. Banks, and M. G. Myers, Jr. 2002.** Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem* 277: 41547-55.
240. **Kokkotou, E. G., N. A. Tritos, J. W. Mastaitis, L. Sliker, and E. Maratos-Flier. 2001.** Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. *Endocrinology* 142: 680-6.
241. **Kolaczynski, J. W., R. V. Considine, J. Ohannesian, C. Marco, I. Opentanova, M. R. Nyce, M. Myint, and J. F. Caro. 1996.** Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45: 1511-5.

242. **Kong, W. M., S. Stanley, J. Gardiner, C. Abbott, K. Murphy, A. Seth, I. Connoley, M. Ghatei, D. Stephens, and S. Bloom. 2003.** A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *Faseb J* 17: 1688-90.
243. **Koylu, E. O., P. R. Couceyro, P. D. Lambert, and M. J. Kuhar. 1998.** Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 391: 115-32.
244. **Koylu, E. O., P. R. Couceyro, P. D. Lambert, N. C. Ling, E. B. DeSouza, and M. J. Kuhar. 1997.** Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* 9: 823-33.
245. **Krasnow, S. M., G. S. Fraley, S. M. Schuh, J. W. Baumgartner, D. K. Clifton, and R. A. Steiner. 2003.** A role for galanin-like peptide in the integration of feeding, body weight regulation, and reproduction in the mouse. *Endocrinology* 144: 813-22.
246. **Krieger, D. T. 1980.** Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinology* 106: 649-54.
247. **Kristensen, P., M. E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K. N. Christjansen, B. S. Wulff, J. T. Clausen, P. B. Jensen, O. D. Madsen, N. Vrang, P. J. Larsen, and S. Hastrup. 1998.** Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-6.
248. **Kyrkouli, S. E., B. G. Stanley, R. D. Seirafi, and S. F. Leibowitz. 1990.** Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides* 11: 995-1001.
249. **Ladyman, S. R., and D. R. Grattan. 2004.** Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* 145: 3704-11.
250. **Laimer, M., C. F. Ebenbichler, S. Kaser, A. Sandhofer, H. Weiss, H. Nehoda, F. Aigner, and J. R. Patsch. 2002.** Weight loss increases soluble leptin receptor levels and the soluble receptor bound fraction of leptin. *Obes Res* 10: 597-601.
251. **Lambert, P. D., P. R. Couceyro, K. M. McGirr, S. E. Dall Vechia, Y. Smith, and M. J. Kuhar. 1998.** CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29: 293-8.
252. **Lamberts, S. W., and R. M. Macleod. 1990.** Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 70: 279-318.
253. **Lammert, A., W. Kiess, A. Bottner, A. Glasow, and J. Kratzsch. 2001.** Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 982-8.
254. **Lansdorp, P. M., L. A. Aarden, J. Calafat, and W. P. Zeiljemaker. 1986.** A growth-factor dependent B-cell hybridoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 132: 105-13.
255. **Larm, J. A., and A. L. Gundlach. 2000.** Galanin-like peptide (GALP) mRNA expression is restricted to arcuate nucleus of hypothalamus in adult male rat brain. *Neuroendocrinology* 72: 67-71.
256. **Larsen, L., and C. Ropke. 2002.** Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 110: 833-44.
257. **Lawrence, C. B., F. M. Baudoin, and S. M. Luckman. 2002a.** Centrally administered galanin-like peptide modifies food intake in the rat: a comparison with galanin. *J Neuroendocrinol* 14: 853-60.
258. **Lawrence, C. B., K. L. Ellacott, and S. M. Luckman. 2002b.** PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology* 143: 360-7.
259. **Lawrence, C. B., T. Williams, and S. M. Luckman. 2003.** Intracerebroventricular galanin-like peptide induces different brain activation compared with galanin. *Endocrinology* 144: 3977-84.
260. **Lawrence, C. B., F. Celsi, J. Brennand, and S. M. Luckman. 2000.** Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci* 3: 645-6.

261. **Lawrence, C. B., Y. L. Liu, M. J. Stock, and S. M. Luckman. 2004.** Anorectic actions of prolactin-releasing peptide are mediated by corticotropin-releasing hormone receptors. *Am J Physiol* 286: R101-7.
262. **Lebrethon, M. C., E. Vandersmissen, A. Gerard, A. S. Parent, J. L. Junien, and J. P. Bourguignon. 2000.** In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. *Endocrinology* 141: 1464-9.
263. **Lecklin, A., P. Etu-Seppala, H. Stark, and L. Tuomisto. 1998.** Effects of intracerebroventricularly infused histamine and selective H1, H2 and H3 agonists on food and water intake and urine flow in Wistar rats. *Brain Res* 793: 279-88.
264. **Leclercq-Meyer, V., R. V. Considine, A. Sener, and W. J. Malaisse. 1996.** Do leptin receptors play a functional role in the endocrine pancreas? *Biochem Biophys Res Commun* 229: 794-8.
265. **Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee, and J. M. Friedman. 1996.** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-5.
266. **LeFeuvre, R. A., N. J. Rothwell, and M. J. Stock. 1987.** Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. *Neuropharmacology* 26: 1217-21.
267. **Legradi, G., and R. M. Lechan. 1998.** The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 139: 3262-70.
268. **Legradi, G., C. H. Emerson, R. S. Ahima, J. S. Flier, and R. M. Lechan. 1997.** Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138: 2569-76.
269. **Leibowitz, S. F., and K. E. Wortley. 2004.** Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25: 473-504.
270. **Lerant, A., B. Kanyicska, and M. E. Freeman. 2001.** Nuclear translocation of STAT5 and increased expression of Fos related antigens (FRAs) in hypothalamic dopaminergic neurons after prolactin administration. *Brain Res* 904: 259-69.
271. **Levy, D. E., and D. G. Gilliland. 2000.** Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene* 19: 2505-10.
272. **Licinio, J., C. Mantzoros, A. B. Negrao, G. Cizza, M. L. Wong, P. B. Bongiorno, G. P. Chrousos, B. Karp, C. Allen, J. S. Flier, and P. W. Gold. 1997.** Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* 3: 575-9.
273. **Licinio, J., A. B. Negrao, C. Mantzoros, V. Kaklamani, M. L. Wong, P. B. Bongiorno, A. Mulla, L. Cearnal, J. D. Veldhuis, J. S. Flier, S. M. McCann, and P. W. Gold. 1998.** Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2541-6.
274. **Liu, B., M. Gross, J. ten Hoeve, and K. Shuai. 2001.** A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3203-7.
275. **Liu, G., L. Robillard, B. Banihashemi, and P. R. Albert. 2002.** Growth hormone-induced diacylglycerol and ceramide formation via G $\alpha$ i3 and G $\beta$  $\gamma$  in GH4 pituitary cells. Potentiation by dopamine-D2 receptor activation. *J Biol Chem* 277: 48427-33.
276. **Liu, X., G. W. Robinson, K. U. Wagner, L. Garrett, A. Wynshaw-Boris, and L. Hennighausen. 1997.** Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 11: 179-86.
277. **Lokrantz, C. M., K. Uvnas-Moberg, and J. M. Kaplan. 1997.** Effects of central oxytocin administration on intraoral intake of glucose in deprived and nondeprived rats. *Physiol Behav* 62: 347-52.



278. **Lollmann, B., S. Gruninger, A. Stricker-Krongrad, and M. Chiesi. 1997.** Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 648-52.
279. **Lookingland, K. J., J. M. Farah, Jr., K. L. Lovell, and K. E. Moore. 1985.** Differential regulation of tuberohypophysial dopaminergic neurons terminating in the intermediate lobe and in the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 40: 145-51.
280. **Lu, X. Y., G. S. Barsh, H. Akil, and S. J. Watson. 2003.** Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* 23: 7863-72.
281. **Lubkin, M., and A. Stricker-Krongrad. 1998.** Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 241-5.
282. **Ludwig, M., and G. Leng. 2000.** GABAergic projection from the arcuate nucleus to the supraoptic nucleus in the rat. *Neurosci Lett* 281: 195-7.
283. **Lundin, A., H. Rondahl, E. Walum, and M. Wilcke. 2000.** Expression and intracellular localization of leptin receptor long isoform-GFP chimera. *Biochim Biophys Acta* 1499: 130-138.
284. **Madiehe, A. M., A. O. Schaffhauser, D. H. Braymer, G. A. Bray, and D. A. York. 2000.** Differential expression of leptin receptor in high- and low-fat-fed Osborne-Mendel and S5B/Pl rats. *Obes Res* 8: 467-74.
285. **Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, S. Ranganathan, P. A. Kern, and J. M. Friedman. 1995.** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-61.
286. **Maness, L. M., A. J. Kastin, C. L. Farrell, and W. A. Banks. 1998.** Fate of leptin after intracerebroventricular injection into the mouse brain. *Endocrinology* 139: 4556-62.
287. **Mantzoros, C. S., S. Moschos, I. Avramopoulos, V. Kaklamani, A. Liolios, D. E. Doulgerakis, I. Griveas, N. Katsilambros, and J. S. Flier. 1997.** Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3408-13.
288. **Margetic, S., C. Gazzola, G. G. Pegg, and R. A. Hill. 2002.** Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1407-33.
289. **Mark, A. L., K. Rahmouni, M. Correia, and W. G. Haynes. 2003.** A leptin-sympathetic-leptin feedback loop: potential implications for regulation of arterial pressure and body fat. *Acta Physiol Scand* 177: 345-9.
290. **Marsh, A. J., M. A. Fontes, S. Killinger, D. B. Pawlak, J. W. Polson, and R. A. Dampney. 2003.** Cardiovascular responses evoked by leptin acting on neurons in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus. *Hypertension* 42: 488-93.
291. **Maruyama, M., H. Matsumoto, K. Fujiwara, C. Kitada, S. Hinuma, H. Onda, M. Fujino, and K. Inoue. 1999.** Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain. *Endocrinology* 140: 2326-33.
292. **Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori, and K. Nakao. 1997.** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3: 1029-33.
293. **McBride, K. M., G. Banninger, C. McDonald, and N. C. Reich. 2002.** Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *Embo J* 21: 1754-63.
294. **McCowen, K. C., J. C. Chow, and R. J. Smith. 1998.** Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology* 139: 4442-7.
295. **Meager, A., and R. E. Das. 1994.** International collaborative study of the candidate international standards for human tumour necrosis factors alpha (hTNF-alpha) and beta (hTNF-beta) and for murine tumour necrosis factor alpha (mTNF-alpha). *J Immunol Methods* 170: 1-13.

296. **Meister, B. 2000.** Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm* 59: 265-304.
297. **Meister, B., and M. L. Hakansson. 2001.** Leptin receptors in hypothalamus and circumventricular organs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 610-7.
298. **Memo, M., E. Carboni, M. Trabucchi, M. O. Carruba, and P. F. Spano. 1985.** Dopamine inhibition of neurotensin-induced increase in  $Ca^{2+}$  influx into rat pituitary cells. *Brain Res* 347: 253-7.
299. **Menzaghi, F., S. C. Heinrichs, E. M. Pich, F. J. Tilders, and G. F. Koob. 1993.** Functional impairment of hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons with immunotargeted toxins enhances food intake induced by neuropeptide Y. *Brain Res* 618: 76-82.
300. **Meyer, C., D. Robson, N. Rackovsky, V. Nadkarni, and J. Gerich. 1997.** Role of the kidney in human leptin metabolism. *Am J Physiol* 273: E903-7.
301. **Meyer, T., K. Gavenis, and U. Vinkemeier. 2002.** Cell type-specific and tyrosine phosphorylation-independent nuclear presence of STAT1 and STAT3. *Exp Cell Res* 272: 45-55.
302. **Miller, S. G., P. De Vos, M. Guerre-Millo, K. Wong, T. Hermann, B. Staels, M. R. Briggs, and J. Auwerx. 1996.** The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5507-11.
303. **Minokoshi, Y., M. S. Haque, and T. Shimazu. 1999.** Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* 48: 287-91.
304. **Miscia, S., M. Marchisio, A. Grilli, V. Di Valerio, L. Centurione, G. Sabatino, F. Garaci, G. Zauli, E. Bonvini, and A. Di Baldassarre. 2002.** Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells. *Cell Growth Differ* 13: 13-8.
305. **Mizuno, T. M., and C. V. Mobbs. 1999.** Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 140: 814-7.
306. **Moberg, G. P., L. L. Bellinger, and V. E. Mendel. 1975.** Effect of meal feeding on daily rhythms of plasma corticosterone and growth hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 19: 160-9.
307. **Moinat, M., C. Deng, P. Muzzin, F. Assimacopoulos-Jeannet, J. Seydoux, A. G. Dulloo, and J. P. Giacobino. 1995.** Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett* 373: 131-4.
308. **Mondal, M. S., M. Nakazato, Y. Date, N. Murakami, M. Yanagisawa, and S. Matsukura. 1999.** Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 495-9.
309. **Montague, C. T., J. B. Prins, L. Sanders, J. E. Digby, and S. O'Rahilly. 1997.** Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 46: 342-7.
310. **Morimoto, T., Y. Yamamoto, and A. Yamatodani. 2001.** Brain histamine and feeding behavior. *Behav Brain Res* 124: 145-50.
311. **Morimoto, T., Y. Yamamoto, J. I. Mobarakeh, K. Yanai, T. Watanabe, and A. Yamatodani. 1999.** Involvement of the histaminergic system in leptin-induced suppression of food intake. *Physiol Behav* 67: 679-83.
312. **Morrison, S. F. 1999.** RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276: R962-73.
313. **Morton, N. M., V. Emilsson, Y. L. Liu, and M. A. Cawthorne. 1998.** Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* 273: 26194-201.
314. **Mountjoy, K. G., M. T. Mortrud, M. J. Low, R. B. Simerly, and R. D. Cone. 1994.** Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8: 1298-308.

315. **Münzberg, H., J. S. Flier, and C. Bjorbaek. 2004.** Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145: 4880-9.
316. **Münzberg, H., L. Huo, E. A. Nillni, A. N. Hollenberg, and C. Bjorbaek. 2003.** Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 144: 2121-31.
317. **Murakami, T., T. Yamashita, M. Iida, M. Kuwajima, and K. Shima. 1997.** A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 26-9.
318. **Nakagawa, T., M. Ono-Kishino, E. Sugaru, M. Yamanaka, M. Taiji, and H. Noguchi. 2002.** Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 185-91.
319. **Nambu, T., T. Sakurai, K. Mizukami, Y. Hosoya, M. Yanagisawa, and K. Goto. 1999.** Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827: 243-60.
320. **Natarajan, C., S. Sriram, G. Muthian, and J. J. Bright. 2004.** Signaling through JAK2-STAT5 pathway is essential for IL-3-induced activation of microglia. *Glia* 45: 188-96.
321. **Nedergaard, J., V. Golozoubova, A. Matthias, A. Asadi, A. Jacobsson, and B. Cannon. 2001.** UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504: 82-106.
322. **Ni, C. W., H. J. Hsieh, Y. J. Chao, and D. L. Wang. 2004.** Interleukin-6-induced JAK2/STAT3 signaling pathway in endothelial cells is suppressed by hemodynamic flow. *Am J Physiol* 287: C771-80.
323. **Niimi, M., J. Takahara, M. Sato, and K. Kawanishi. 1989.** Sites of origin of growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the stalk-median eminence of the rat. *Peptides* 10: 605-8.
324. **Nishiyama, M., S. Makino, K. Asaba, and K. Hashimoto. 1999.** Leptin effects on the expression of type-2 CRH receptor mRNA in the ventromedial hypothalamus in the rat. *J Neuroendocrinol* 11: 307-14.
325. **Niswender, K. D., G. J. Morton, W. H. Stearns, C. J. Rhodes, M. G. Myers, Jr., and M. W. Schwartz. 2001.** Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413: 794-5.
326. **Niswender, K. D., B. Gallis, J. E. Blevins, M. A. Corson, M. W. Schwartz, and D. G. Baskin. 2003.** Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 3-kinase activation by insulin and leptin. *J Histochem Cytochem* 51: 275-83.
327. **Ohata, H., K. Suzuki, Y. Oki, and T. Shibasaki. 2000.** Urocortin in the ventromedial hypothalamic nucleus acts as an inhibitor of feeding behavior in rats. *Brain Res* 861: 1-7.
328. **Ohtaki, T., S. Kumano, Y. Ishibashi, K. Ogi, H. Matsui, M. Harada, C. Kitada, T. Kurokawa, H. Onda, and M. Fujino. 1999.** Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus. *J Biol Chem* 274: 37041-5.
329. **Oldfield, B. J., M. E. Giles, A. Watson, C. Anderson, L. M. Colvill, and M. J. McKinley. 2002.** The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. *Neuroscience* 110: 515-26.
330. **Ollmann, M. M., B. D. Wilson, Y. K. Yang, J. A. Kerns, Y. Chen, I. Gantz, and G. S. Barsh. 1997.** Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-8.
331. **Olson, B. R., M. D. Drutarosky, M. S. Chow, V. J. Hruby, E. M. Stricker, and J. G. Verbalis. 1991.** Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12: 113-8.
332. **O'Shea, J. J., M. Gadina, and R. D. Schreiber. 2002.** Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl: S121-31.
333. **Otero, M., R. Lago, F. Lago, F. F. Casanueva, C. Dieguez, J. J. Gomez-Reino, and O. Gualillo. 2005.** Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett* 579: 295-301.

334. **Overduin, M., C. B. Rios, B. J. Mayer, D. Baltimore, and D. Cowburn. 1992.** Three-dimensional solution structure of the src homology 2 domain of c-abl. *Cell* 70: 697-704.
335. **Parent, A. S., M. C. Lebrethon, A. Gerard, E. Vandersmissen, and J. P. Bourguignon. 2000.** Leptin effects on pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from the adult rat hypothalamus and interaction with cocaine and amphetamine regulated transcript peptide and neuropeptide Y. *Regul Pept* 92: 17-24.
336. **Park, H. Y., H. M. Kwon, H. J. Lim, B. K. Hong, J. Y. Lee, B. E. Park, Y. Jang, S. Y. Cho, and H. S. Kim. 2001.** Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 33: 95-102.
337. **Paukku, K., and O. Silvennoinen. 2004.** STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 435-55.
338. **Paxinos, G., and C. Watson. 1998.** The rat brain in stereotaxic coordinates.
339. **Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, and C. L. Wellman. 1995a.** Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp Neurol* 131: 229-38.
340. **Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, and F. Collins. 1995b.** Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-3.
341. **Pereira-da-Silva, M., M. A. Torsoni, H. V. Nourani, V. D. Augusto, C. T. Souza, A. L. Gasparetti, J. B. Carnevali, G. Ventrucci, M. C. Marcondes, A. P. Cruz-Neto, M. J. Saad, A. C. Boschero, E. M. Carneiro, and L. A. Velloso. 2003.** Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology* 144: 4831-40.
342. **Pierroz, D. D., M. Ziotopoulou, L. Ungsuan, S. Moschos, J. S. Flier, and C. S. Mantzoros. 2002.** Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 51: 1337-45.
343. **Pralong, F. P., R. Roduit, G. Waeber, E. Castillo, F. Mosimann, B. Thorens, and R. C. Gaillard. 1998.** Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 139: 4264-8.
344. **Prat, A., K. Biernacki, K. Wosik, and J. P. Antel. 2001.** Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36: 145-55.
345. **Qu, D., D. S. Ludwig, S. Gammeltoft, M. Piper, M. A. Pelleymounter, M. J. Cullen, W. F. Mathes, R. Przypek, R. Kanarek, and E. Maratos-Flier. 1996.** A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-7.
346. **Rayner, D. V. 2001.** The sympathetic nervous system in white adipose tissue regulation. *Proc Nutr Soc* 60: 357-64.
347. **Rayner, D. V., and P. Trayhurn. 2001.** Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med* 79: 8-20.
348. **Redzic, Z. B., and M. B. Segal. 2004.** The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 1695-716.
349. **Reinhardt, R. R., E. Chin, J. Zhou, M. Taira, T. Murata, V. C. Manganiello, and C. A. Bondy. 1995.** Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest* 95: 1528-38.
350. **Richard, D., Q. Huang, and E. Timofeeva. 2000.** The corticotropin-releasing hormone system in the regulation of energy balance in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2: S36-9.
351. **Rivest, S. 2002.** Does circulating leptin have the ability to cross the blood-brain barrier and target neurons directly? *Endocrinology* 143: 3211-3.
352. **Rizk, N. M., D. Stammers, G. Preibisch, and J. Eckel. 2001.** Leptin and tumor necrosis factor- $\alpha$  induce the tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription proteins in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology* 142: 3027-32.

353. **Robson, A. J., K. Rousseau, A. S. Loudon, and F. J. Ebling. 2002.** Cocaine and amphetamine-regulated transcript mRNA regulation in the hypothalamus in lean and obese rodents. *J Neuroendocrinol* 14: 697-709.
354. **Rogers, R. C., and G. E. Hermann. 1985.** Dorsal medullary oxytocin, vasopressin, oxytocin antagonist, and TRH effects on gastric acid secretion and heart rate. *Peptides* 6: 1143-8.
355. **Roland, B. L., S. W. Sutton, S. J. Wilson, L. Luo, J. Pyati, R. Huvar, M. G. Erlander, and T. W. Lovenberg. 1999.** Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* 140: 5736-45.
356. **Rollinghoff, M., B. T. Rouse, and N. L. Warner. 1973.** Tumor immunity to murine plasma cell tumors. I. Tumor-associated transplantation antigens of NZB and BALB-c plasma cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 50: 159-72.
357. **Rondeel, J. M., R. Heide, W. J. de Greef, H. van Toor, G. A. van Haasteren, W. Klootwijk, and T. J. Visser. 1992.** Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 56: 348-53.
358. **Rondini, T. A., S. P. Baddini, L. F. Sousa, J. C. Bittencourt, and C. F. Elias. 2004.** Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. *Neuroscience* 125: 735-48.
359. **Ross, G., T. Hübschle, U. Pehl, H. A. Braun, K. Voigt, R. Gerstberger, and J. Roth. 2003.** Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs: the role of cytokines and prostaglandins. *J Appl Physiol* 94: 1395-402.
360. **Rossi, M., S. A. Beak, S. J. Choi, C. J. Small, D. G. Morgan, M. A. Ghatei, D. M. Smith, and S. R. Bloom. 1999.** Investigation of the feeding effects of melanin concentrating hormone on food intake--action independent of galanin and the melanocortin receptors. *Brain Res* 846: 164-70.
361. **Rossi, M., M. S. Kim, D. G. Morgan, C. J. Small, C. M. Edwards, D. Sunter, S. Abusnana, A. P. Goldstone, S. H. Russell, S. A. Stanley, D. M. Smith, K. Yagaloff, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1998.** A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139: 4428-31.
362. **Rummel, C., T. Voss, K. Matsumura, S. Korte, R. Gerstberger, J. Roth, and T. Hübschle. 2005.** Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Comp Neurol.* (in Druck).
363. **Rycyzyn, M. A., and C. V. Clevenger. 2002.** The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6790-5.
364. **Sahu, A. 1998.** Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* 139: 795-8.
365. **Sahu, A. 2003.** Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 24: 225-53.
366. **Sahu, A. 2004.** Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145: 2613-20.
367. **Sahu, A., R. E. Carraway, and Y. P. Wang. 2001.** Evidence that neurotensin mediates the central effect of leptin on food intake in rat. *Brain Res* 888: 343-347.
368. **Sahu, A., L. Nguyen, and R. M. O'Doherty. 2002.** Nutritional regulation of hypothalamic leptin receptor gene expression is defective in diet-induced obesity. *J Neuroendocrinol* 14: 887-93.
369. **Saito, Y., H. P. Nothacker, Z. Wang, S. H. Lin, F. Leslie, and O. Civelli. 1999.** Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* 400: 265-9.
370. **Sakaguchi, T., M. Takahashi, and G. A. Bray. 1988.** Lateral hypothalamus and sympathetic firing rate. *Am J Physiol* 255: R507-12.

371. **Sakurai, T. 1999.** Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept* 85: 25-30.
372. **Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma, and M. Yanagisawa. 1998.** Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 1 page following 696.
373. **Saladin, R., P. De Vos, M. Guerre-Millo, A. Leturque, J. Girard, B. Staels, and J. Auwerx. 1995.** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-9.
374. **Sanchez-Margalet, V., and C. Martin-Romero. 2001.** Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. *Cell Immunol* 211: 30-6.
375. **Saper, C. B. 1985.** Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections. *J Comp Neurol* 237: 21-46.
376. **Saper, C. B., A. D. Loewy, L. W. Swanson, and W. M. Cowan. 1976.** Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res* 117: 305-12.
377. **Sarraf, P., R. C. Frederich, E. M. Turner, G. Ma, N. T. Jaskowiak, D. J. Rivet, 3rd, J. S. Flier, B. B. Lowell, D. L. Fraker, and H. R. Alexander. 1997.** Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 185: 171-5.
378. **Satoh, N., Y. Ogawa, G. Katsuura, M. Hayase, T. Tsuji, K. Imagawa, Y. Yoshimasa, S. Nishi, K. Hosoda, and K. Nakao. 1997.** The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett* 224: 149-52.
379. **Sawchenko, P. E. 1987.** Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus. *Brain Res* 437: 253-63.
380. **Sawchenko, P. E. 1998.** Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol* 402: 435-41.
381. **Sawchenko, P. E., and L. W. Swanson. 1982.** Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205: 260-72.
382. **Sawchenko, P. E., and L. W. Swanson. 1983.** The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. *Prog Brain Res* 60: 19-29.
383. **Schindler, C., and J. E. Darnell Jr. 1995.** Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64: 621-51.
384. **Schiöth, H. B., R. Muceniece, and J. E. Wikberg. 1997.** Characterization of the binding of MSH-B, HB-228, GHRP-6 and 153N-6 to the human melanocortin receptor subtypes. *Neuropeptides* 31: 565-71.
385. **Schmidt, R. F., G. Thews, and F. Lang. 2004.** *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
386. **Schoeller, D. A., L. K. Cella, M. K. Sinha, and J. F. Caro. 1997.** Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest* 100: 1882-7.
387. **Schwartz, M. W., R. J. Seeley, L. A. Campfield, P. Burn, and D. G. Baskin. 1996a.** Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-6.
388. **Schwartz, M. W., E. Peskind, M. Raskind, E. J. Boyko, and D. Porte, Jr. 1996b.** Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2: 589-93.
389. **Schwartz, M. W., R. J. Seeley, S. C. Woods, D. S. Weigle, L. A. Campfield, P. Burn, and D. G. Baskin. 1997.** Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46: 2119-23.

390. **Schwartz, M. W., D. G. Baskin, T. R. Bukowski, J. L. Kuijper, D. Foster, G. Lasser, D. E. Prunkard, D. Porte, Jr., S. C. Woods, R. J. Seeley, and D. S. Weigle. 1996c.** Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45: 531-5.
391. **Seeley, R. J., C. A. Matson, M. Chavez, S. C. Woods, M. F. Dallman, and M. W. Schwartz. 1996.** Behavioral, endocrine, and hypothalamic responses to involuntary overfeeding. *Am J Physiol* 271: R819-23.
392. **Seoane, L. M., E. Carro, S. Tovar, F. F. Casanueva, and C. Dieguez. 2000.** Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regul Pept* 92: 25-9.
393. **Seth, A., S. Stanley, P. Jethwa, J. Gardiner, M. Ghatei, and S. Bloom. 2004.** Galanin-like peptide stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone in vitro and may mediate the effects of leptin on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 145: 743-50.
394. **Shi, W., M. Inoue, M. Minami, K. Takeda, M. Matsumoto, Y. Matsuda, T. Kishimoto, and S. Akira. 1996.** The genomic structure and chromosomal localization of the mouse STAT3 gene. *Int Immunol* 8: 1205-11.
395. **Shimizu-Albergine, M., D. L. Ippolito, and J. A. Beavo. 2001.** Downregulation of fasting-induced cAMP response element-mediated gene induction by leptin in neuropeptide Y neurons of the arcuate nucleus. *J Neurosci* 21: 1238-46.
396. **Shirasaka, T., M. Nakazato, S. Matsukura, M. Takasaki, and H. Kannan. 1999.** Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol* 277: R1780-5.
397. **Shutter, J. R., M. Graham, A. C. Kinsey, S. Scully, R. Luthy, and K. L. Stark. 1997.** Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11: 593-602.
398. **Sierra-Honigsmann, M. R., A. K. Nath, C. Murakami, G. Garcia-Cardena, A. Papapetropoulos, W. C. Sessa, L. A. Madge, J. S. Schechner, M. B. Schwabb, P. J. Polverini, and J. R. Flores-Riveros. 1998.** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281: 1683-6.
399. **Sinha, M. K., I. Opentanova, J. P. Ohannesian, J. W. Kolaczynski, M. L. Heiman, J. Hale, G. W. Becker, R. R. Bowsher, T. W. Stephens, and J. F. Caro. 1996.** Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98: 1277-82.
400. **Smith-Kirwin, S. M., D. M. O'Connor, J. De Johnston, E. D. Lancey, S. G. Hassink, and V. L. Funanage. 1998.** Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1810-3.
401. **Spina, M., E. Merlo-Pich, R. K. Chan, A. M. Basso, J. Rivier, W. Vale, and G. F. Koob. 1996.** Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 273: 1561-4.
402. **Stanley, B. G., and S. F. Leibowitz. 1984.** Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci* 35: 2635-42.
403. **Stanley, B. G., S. E. Kyrkouli, S. Lampert, and S. F. Leibowitz. 1986.** Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7: 1189-92.
404. **Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola, and D. J. Hilton. 1997.** A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387: 917-21.
405. **Stepanyan, Z., A. Kocharyan, M. Pyrski, T. Hübschle, A. M. Watson, S. Schulz, and W. Meyerhof. 2003.** Leptin-target neurones of the rat hypothalamus express somatostatin receptors. *J Neuroendocrinol* 15: 822-30.
406. **Stephens, T. W., M. Basinski, P. K. Bristow, J. M. Bue-Valleskey, S. G. Burgett, L. Craft, J. Hale, J. Hoffmann, H. M. Hsiung, A. Kriauciunas, W. Mackellar, P. R. Rosteck, B. Schoner, D. Smith, F. C. Tinsley, X. Y. Zhang, and M. Heiman. 1995.** The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377: 530-2.

407. **Storlien, L. H., and D. J. Albert. 1972.** The effect of VMH lesions, lateral cuts and anterior cuts of food intake, activity level, food motivation, and reactivity to taste. *Physiol Behav* 9: 191-7.
408. **Strazzullo, P., L. Scalfi, F. Branca, G. Cairella, F. Garbagnati, A. Siani, G. Barba, P. Rubba, and G. Mancina. 2004.** Nutrition and prevention of ischemic stroke: present knowledge, limitations and future perspectives. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14: 97-114.
409. **Suga, A., T. Hirano, S. Inoue, M. Tsuji, T. Osaka, Y. Namba, M. Miura, and M. Adachi. 1999a.** Plasma leptin levels and triglyceride secretion rates in VMH-lesioned obese rats: a role of adiposity. *Am J Physiol* 276: E650-7.
410. **Suga, A., T. Hirano, H. Kageyama, M. Kashiba, J. Oka, T. Osaka, Y. Namba, M. Tsuji, M. Miura, M. Adachi, and S. Inoue. 1999b.** Rapid increase in circulating leptin in ventromedial hypothalamus-lesioned rats: role of hyperinsulinemia and implication for upregulation mechanism. *Diabetes* 48: 2034-8.
411. **Suganami, E., H. Takagi, H. Ohashi, K. Suzuma, I. Suzuma, H. Oh, D. Watanabe, T. Ojima, T. Suganami, Y. Fujio, K. Nakao, Y. Ogawa, and N. Yoshimura. 2004.** Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 53: 2443-8.
412. **Swanson, L. W., and H. G. Kuypers. 1980.** A direct projection from the ventromedial nucleus and retrochiasmatic area of the hypothalamus to the medulla and spinal cord of the rat. *Neurosci Lett* 17: 307-12.
413. **Sweeney, G. 2002.** Leptin signalling. *Cell Signal* 14: 655-63.
414. **Takatsu, Y., H. Matsumoto, T. Ohtaki, S. Kumano, C. Kitada, H. Onda, O. Nishimura, and M. Fujino. 2001.** Distribution of galanin-like peptide in the rat brain. *Endocrinology* 142: 1626-34.
415. **Takenoya, F., H. Funahashi, H. Matsumoto, T. Ohtaki, S. Katoh, H. Kageyama, R. Suzuki, M. Takeuchi, and S. Shioda. 2002.** Galanin-like peptide is co-localized with alpha-melanocyte stimulating hormone but not with neuropeptide Y in the rat brain. *Neurosci Lett* 331: 119-22.
416. **Tanida, M., S. Iwashita, Y. Ootsuka, N. Terui, and M. Suzuki. 2000.** Leptin injection into white adipose tissue elevates renal sympathetic nerve activity dose-dependently through the afferent nerves pathway in rats. *Neurosci Lett* 293: 107-10.
417. **Tannenbaum, G. S., M. Lapointe, W. Gurd, and J. A. Finkelstein. 1990.** Mechanisms of impaired growth hormone secretion in genetically obese Zucker rats: roles of growth hormone-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* 127: 3087-95.
418. **Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Woolf, C. A. Monroe, and R. I. Tepper. 1995.** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-71.
419. **Teglund, S., C. McKay, E. Schuetz, J. M. van Deursen, D. Stravopodis, D. Wang, M. Brown, S. Bodner, G. Grosveld, and J. N. Ihle. 1998.** Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93: 841-50.
420. **Ter Horst, G. J., and P. G. Luiten. 1986.** The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 16: 231-48.
421. **Traebert, M., T. Riediger, S. Whitebread, E. Scharrer, and H. A. Schmid. 2002.** Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 14: 580-6.
422. **Trayhurn, P., J. S. Duncan, and D. V. Rayner. 1995.** Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* 311 ( Pt 3): 729-33.
423. **Trayhurn, P., N. Hoggard, J. G. Mercer, and D. V. Rayner. 1999.** Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1: 22-8.
424. **Tsumanuma, I., L. Jin, S. Zhang, J. M. Bayliss, B. W. Scheithauer, and R. V. Lloyd. 2000.** Leptin signal transduction in the HP75 human pituitary cell line. *Pituitary* 3: 211-20.



425. **Udy, G. B., R. P. Towers, R. G. Snell, R. J. Wilkins, S. H. Park, P. A. Ram, D. J. Waxman, and H. W. Davey. 1997.** Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7239-44.
426. **Uehara, Y., H. Shimizu, K. Ohtani, N. Sato, and M. Mori. 1998.** Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes* 47: 890-3.
427. **Uotani, S., C. Bjorbaek, J. Tornoe, and J. S. Flier. 1999.** Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes* 48: 279-86.
428. **Vaisse, C., J. L. Halaas, C. M. Horvath, J. E. Darnell, Jr., M. Stoffel, and J. M. Friedman. 1996.** Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14: 95-7.
429. **Van Dielen, F. M., C. Van 't Veer, W. A. Buurman, and J. W. Greve. 2002.** Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1708-16.
430. **Van Dijk, G., T. E. Thiele, J. C. Donahay, L. A. Campfield, F. J. Smith, P. Burn, I. L. Bernstein, S. C. Woods, and R. J. Seeley. 1996.** Central infusions of leptin and GLP-1-(7-36) amide differentially stimulate c-FLI in the rat brain. *Am J Physiol* 271: R1096-100.
431. **Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader, and H. R. Davis, Jr. 1997.** Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99: 385-90.
432. **Vanhaesebroeck, B., and M. D. Waterfield. 1999.** Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 253: 239-54.
433. **Vrang, N., P. J. Larsen, P. Kristensen, and M. Tang-Christensen. 2000.** Central administration of cocaine-amphetamine-regulated transcript activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 141: 794-801.
434. **Vuagnat, B. A., D. D. Pierroz, M. Lalaoui, P. Englaro, F. P. Pralong, W. F. Blum, and M. L. Aubert. 1998.** Evidence for a leptin-neuropeptide Y axis for the regulation of growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 67: 291-300.
435. **Wabitsch, M., W. F. Blum, R. Mucbe, M. Braun, F. Hube, W. Rascher, E. Heinze, W. Teller, and H. Hauner. 1997.** Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 100: 808-13.
436. **Wabitsch, M., P. B. Jensen, W. F. Blum, C. T. Christoffersen, P. Englaro, E. Heinze, W. Rascher, W. Teller, H. Tornqvist, and H. Hauner. 1996.** Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 45: 1435-8.
437. **Wang, C., C. J. Billington, A. S. Levine, and C. M. Kotz. 2000.** Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport* 11: 3251-5.
438. **Wang, C., M. A. Mullet, M. J. Glass, C. J. Billington, A. S. Levine, and C. M. Kotz. 2001.** Feeding inhibition by urocortin in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Am J Physiol* 280: R473-80.
439. **Wang, J., R. Liu, M. Hawkins, N. Barzilai, and L. Rossetti. 1998.** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684-8.
440. **Watanobe, H., T. Suda, J. E. Wikberg, and H. B. Schiöth. 1999a.** Evidence that physiological levels of circulating leptin exert a stimulatory effect on luteinizing hormone and prolactin surges in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 162-5.
441. **Watanobe, H., H. B. Schiöth, J. E. Wikberg, and T. Suda. 1999b.** The melanocortin 4 receptor mediates leptin stimulation of luteinizing hormone and prolactin surges in steroid-primed ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 860-4.
442. **Watson, S. J., and H. Akil. 1979.** The presence of two alpha-MSH positive cell groups in rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 58: 101-3.

443. **Watts, A. G., and L. W. Swanson. 1987.** Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol* 258: 230-52.
444. **Wen, Z., Z. Zhong, and J. E. Darnell, Jr. 1995.** Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82: 241-50.
445. **White, D. W., K. K. Kuropatwinski, R. Devos, H. Baumann, and L. A. Tartaglia. 1997.** Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem* 272: 4065-71.
446. **Williams, G., J. A. Harrold, and D. J. Cutler. 2000.** The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc* 59: 385-96.
447. **Williams, G., C. Bing, X. J. Cai, J. A. Harrold, P. J. King, and X. H. Liu. 2001.** The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74: 683-701.
448. **Wilson, B. D., M. M. Ollmann, and G. S. Barsh. 1999.** The role of agouti-related protein in regulating body weight. *Mol Med Today* 5: 250-6.
449. **Wu-Peng, X. S., S. C. Chua, Jr., N. Okada, S. M. Liu, M. Nicolson, and R. L. Leibel. 1997.** Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat. *Diabetes* 46: 513-8.
450. **Xu, B., E. H. Goulding, K. Zang, D. Cepoi, R. D. Cone, K. R. Jones, L. H. Tecott, and L. F. Reichardt. 2003.** Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6: 736-42.
451. **Yamamoto, S., I. Morimoto, K. Kai, T. Arao, T. Fujihira, E. Morita, H. Kannan, and S. Eto. 1999.** Centrally administered murine leptin stimulates plasma arginine-vasopressin secretion and increases the level of mRNA expression in the supraoptic nucleus of conscious rats. *Neuroendocrinology* 70: 207-12.
452. **Yamanaka, A., K. Kunii, T. Nambu, N. Tsujino, A. Sakai, I. Matsuzaki, Y. Miwa, K. Goto, and T. Sakurai. 2000.** Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 859: 404-9.
453. **Yamanaka, A., C. T. Beuckmann, J. T. Willie, J. Hara, N. Tsujino, M. Mieda, M. Tominaga, K. Yagami, F. Sugiyama, K. Goto, M. Yanagisawa, and T. Sakurai. 2003.** Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38: 701-13.
454. **Yaswen, L., N. Diehl, M. B. Brennan, and U. Hochgeschwender. 1999.** Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5: 1066-70.
455. **Yokosuka, M., B. Xu, S. Pu, P. S. Kalra, and S. P. Kalra. 1998.** Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake. *Physiol Behav* 64: 331-8.
456. **Yoshida, K., K. Nakamura, K. Matsumura, K. Kanosue, M. König, H. J. Thiel, Z. Boldogkoi, I. Toth, J. Roth, R. Gerstberger, and T. Hübschle. 2003.** Neurons of the rat preoptic area and the raphe pallidus nucleus innervating the brown adipose tissue express the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Eur J Neurosci* 18: 1848-60.
457. **Yoshida, T., J. W. Kemnitz, and G. A. Bray. 1983.** Lateral hypothalamic lesions and norepinephrine turnover in rats. *J Clin Invest* 72: 919-27.
458. **Yoshimatsu, H., A. Nijima, Y. Oomura, K. Yamabe, and T. Katafuchi. 1984.** Effects of hypothalamic lesion on pancreatic autonomic nerve activity in the rat. *Brain Res* 303: 147-52.
459. **Young, J. K. 2002.** Anatomical relationship between specialized astrocytes and leptin-sensitive neurones. *J Anat* 201: 85-90.
460. **Yu, W. H., A. Walczewska, S. Karanth, and S. M. McCann. 1997a.** Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 138: 5055-8.

461. **Yu, W. H., M. Kimura, A. Walczewska, S. Karanth, and S. M. McCann. 1997b.** Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1023-8.
462. **Zabolotny, J. M., K. K. Bence-Hanulec, A. Stricker-Krongrad, F. Haj, Y. Wang, Y. Minokoshi, Y. B. Kim, J. K. Elmquist, L. A. Tartaglia, B. B. Kahn, and B. G. Neel. 2002.** PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2: 489-95.
463. **Zamorano, P. L., V. B. Mahesh, L. M. De Sevilla, L. P. Chorch, G. K. Bhat, and D. W. Brann. 1997.** Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65: 223-8.
464. **Zaretskaia, M. V., D. V. Zaretsky, and J. A. DiMicco. 2003.** Role of the dorsomedial hypothalamus in thermogenesis and tachycardia caused by microinjection of prostaglandin E2 into the preoptic area in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 340: 1-4.
465. **Zarjevski, N., I. Cusin, R. Vettor, F. Rohner-Jeanrenaud, and B. Jeanrenaud. 1993.** Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133: 1753-8.
466. **Zhang, F., M. B. Basinski, J. M. Beals, S. L. Briggs, L. M. Churgay, D. K. Clawson, R. D. DiMarchi, T. C. Furman, J. E. Hale, H. M. Hsiung, B. E. Schoner, D. P. Smith, X. Y. Zhang, J. P. Wery, and R. W. Schevitz. 1997.** Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387: 206-9.
467. **Zhang, H. H., S. Kumar, A. H. Barnett, and M. C. Eggo. 2000.** Tumour necrosis factor- $\alpha$  exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Mol Cell Endocrinol* 159: 79-88.
468. **Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-32.
469. **Zhao, A. Z., K. E. Bornfeldt, and J. A. Beavo. 1998.** Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest* 102: 869-73.
470. **Zhao, A. Z., J. N. Huan, S. Gupta, R. Pal, and A. Sahu. 2002.** A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nat Neurosci* 5: 727-8.
471. **Zhao, A. Z., M. M. Shinohara, D. Huang, M. Shimizu, H. Eldar-Finkelman, E. G. Krebs, J. A. Beavo, and K. E. Bornfeldt. 2000.** Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J Biol Chem* 275: 11348-54.
472. **Zheng, D., M. H. Wooter, Q. Zhou, and G. L. Dohm. 1996.** The effect of exercise on ob gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 225: 747-50.
473. **Zhu, Y., A. Yamanaka, K. Kunii, N. Tsujino, K. Goto, and T. Sakurai. 2002.** Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiol Behav* 77: 251-7.
474. **Ziotopoulou, M., C. S. Mantzoros, S. M. Hileman, and J. S. Flier. 2000.** Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol* 279: E838-45.
475. **Zlokovic, B. V., S. Jovanovic, W. Miao, S. Samara, S. Verma, and C. L. Farrell. 2000.** Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* 141: 1434-41.

## 8. KAPITEL Anhang

### 8.1. Publikationen

#### 8.1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften

- MÜTZE, J., ROTH, J., GERSTBERGER, R., MATSUMURA, K., HÜBSCHLE, T. (2005). Immunohistochemical evidence of functional leptin receptor expression in neuronal and non-neuronal cells of the rat brain. *Neuroscience Letters* (in revision).
- MÜTZE, J., KORTE, S., K., GERSTBERGER, R., ROTH, J., HÜBSCHLE, T. (2005). Leptin induced nuclear STAT5-translocation in rat hypothalamus. *Brain Research* (in preparation)
- HÜBSCHLE, T., MÜTZE, J., MÜHLRADT, P. F., KORTE, S., K., GERSTBERGER, R., ROTH, J. (2005). Pyrexia, anorexia, adipsia and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptor 2- and 6-agonists MALP-2 and FSL-1. *American Journal of Physiology, Regulators Integrative Comparative Physiology* (in press)
- ROTH, J., RUMMEL, C., HARRÉ, E. M., VOSS, T., MÜTZE, J., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. (2004). Is interleukin-6 the necessary pyrogenic cytokine? *Journal of Thermal Biology* **29**, 383-389.

#### 8.1.2. Veröffentlichte Abstracts

- MÜTZE, J., ROTH, J., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. (2004). Brain leptin target cells indentified with STAT3 immunohistochemistry: evidence of functional leptin receptor expression in brain endothelium. *PPTR Rhodes 2004. Physiology and pharmacology of temperature regulation*, 119.
- RUMMEL, C., VOSS, T., MÜTZE, J., ROTH, J., GERSTBERGER, R., KOBAYASHI, S., MATSUMURA, K., HÜBSCHLE, T. (2004). Pyrogen-induced nuclear STAT3 translocation in endothelium of rat and guinea pig brain. *PPTR Rhodes 2004. Physiology and pharmacology of temperature regulation*, 29.

## 8.2. Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Veterinärphysiologie bedanken.

Unserem Chef („*chief*“) Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für seine fortwährende menschliche Art und dafür, dass er mir die Möglichkeit bot die Doktorarbeit in seinem Institut anzufertigen. Ein sehr großer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Thomas Hübschle, der mich in vorbildlichster Weise betreut, mich in die Hintergründe der Thematik sowie in die Methodik eingeführt und schließlich zum Gelingen dieser Arbeit besonders beigetragen hat. Weiterhin danke ich PD Dr. Joachim Roth für seine geduldige und fortwährende Unterstützung sowie aufmunternden Art.

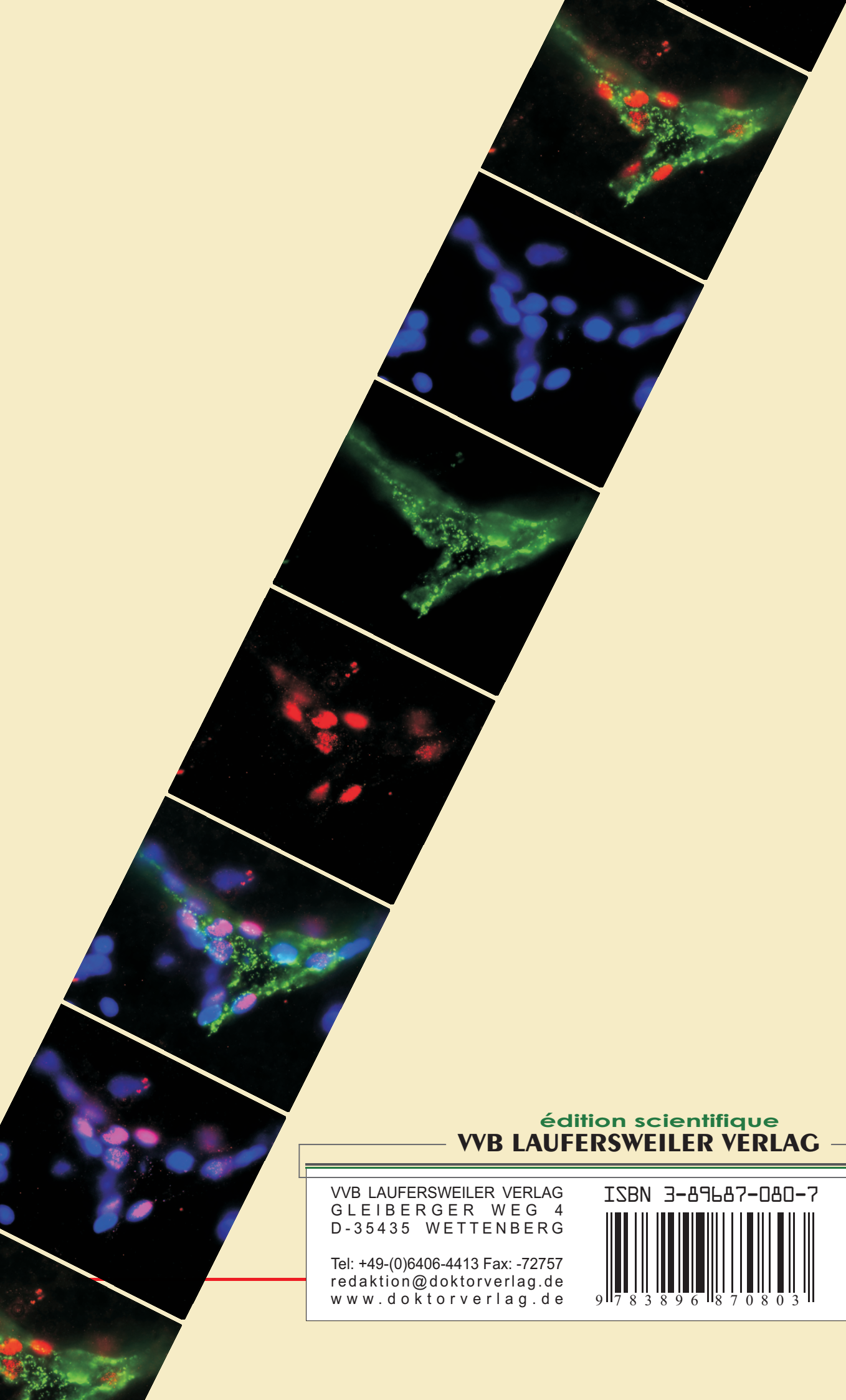
Vielen Dank auch an Eva-Maria Harré und Christoph Rummel, die mir den Einstieg in die Arbeit sehr erleichtert und mich tatkräftig unterstützt haben. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, die dazu beigetragen haben, dass die Physiologie ein derart angenehmer Arbeitsplatz für mich war. Im besonderen hat es mir viel Spaß gemacht mit Thilo Voss und seinen all-nachmittäglichen Kaffee-Pausen sowie mit Daniela Hild, Jolanta Murgott, Doreen Marks und Bärbel Reuter, die mir bei meinen Versuchen unter die Arme gegriffen haben.

Besonders danke ich noch meiner Verlobten Kerstin Eßer, die immer vollstes Verständnis für meine Arbeit gezeigt hat und mir schon während meines Studiums eng zur Seite stand. Ebenso danke ich meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht sowohl moralisch als auch materiell unterstützt haben. Schließlich danke ich all meinen Verwandten, Freunden und Bekannten für ihre seelische und ausgleichende Unterstützung.

### 8.3. Erklärung

Ich erkläre:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-080-7



9 783896 870803